Experimentelle Forschung Pharma Schering AG Berlin
Department Endokrinpharmakologie
Leiter der Abt.: Privatdozent Dr. F. Neumann

DIE HORMONALE KONTROLLE DER BEFRUCHTUNG

Entwicklung eines tierexperimentellen Modells zur Untersuchung von gestagenen Steroiden beim Kaninchen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ernst Wolf Büsing

aus Göttingen

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0039

Experimentelle Forschung Pharma Schering AG Berlin
Department Endokrinpharmakologie
Leiter der Abt.: Privatdozent Dr. F. Neumann

DIE HORMONALE KONTROLLE DER BEFRUCHTUNG

Entwicklung eines tierexperimentellen Modells zur Untersuchung von gestagenen Steroiden beim Kaninchen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ernst Wolf Büsing

aus Göttingen

Referent: Professor Dr. med. M. K r a m e r

Korrefferent: Professor Dr. med. J. H a m m e r s t e i n

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 18. April 1973

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung

Das Dilemma der Übervölkerung 4

a) Die Historie

b) Die Probleme

c) Die Konsequenzen

Verschiedene Möglichkeiten zur Fertilitätskontrolle 6

Ovulationshemmung

Befruchtungshemmung

Entwicklungshemmung

Der Weg der Spermatozoe von der Ejakulation bis zur Syngamie 11

1. Die Passage der Spermien in und durch die Zervix

a) Das vaginale Milieu

b) Der Zervikalschleim

2. Der Transport im Uterus

3. Die uterotubare Junktion

4. Der Transport in der Tube

5. Die Befruchtung

a) Die akrosomale Reaktion

b) Die Penetration der Zona pellucida

c) Der Kontakt des Spermiums mit dem Vitellus, die Inkorporation und Syngamie

d) Die Kapazitation

Das Wesen der Kapazitation 19

Allgemeine Definition

Der Dekapazitationsfaktor (DF)

Die Oberflächentheorie des DF

"Zervixfaktor" und "Kapazitation" - neue Angriffspunkte der Kontrazeption? 21

Seite

Material und Methoden 22

1. Allgemeine Vorbemerkungen
2. Tiermaterial
3. Versuchsanordnung 23
   a) Medikation
   b) Superovulation
   c) Spermagewinnung
   d) Qualifizierung und Weiterbehandlung der gewonnenen Ejakulate
   e) Künstliche Insemination
4. Versuchsauswertung 29
   Tötung und Präparation der Tiere
   Kollektion und Klassifizierung der Ova
   Die McPhail Skala 3o

Ergebnisse 31

A) Kontrollen

B) Die Wirkung von Progesteron auf Befruchtung und Endometrium

1. Die Abhängigkeit von der Behandlungsdauer
   a) Die Befruchtung
   b) Das Endometrium
2. Die Abhängigkeit von der Dosis
   a) Die Befruchtung
   b) Das Endometrium
3. Die Fortdauer der Progesteronwirkung
   a) Die Befruchtung
   b) Das Endometrium
4. Progestionale Endometrium-Transformation und Befruchtungshemmung

Diskussion 45

A) Das Ziel der Arbeit

B) Ausblick auf die Verhältnisse beim Menschen

Zusammenfassung 5o

Literaturverzeichnis 51-6o

Anhang

EINLEITUNG

Das Dilemma der Übervölkerung

a) Die Historie

Das Problem der Bevölkerungsexplosion gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. Um 185o schätzte man die Zahl der auf der Erde lebenden Menschen auf wenig über eine Milliarde. Um 195o waren es mehr als doppelt so viel und nach 2o Jahren ist jetzt eine Zahl von über 3,5 Milliarden erreicht.

19oo	1 61o ooo ooo
195o	2 4oo ooo ooo
196o	3 o1o ooo ooo
1968	3 549 ooo ooo

(Demographic year book 197o)

b) Die Probleme

Damit stellen sich in immer stärker werdendem Maße Probleme: Die rasche Bevölkerungszunahme zieht notwendigerweise Nahrungsmittelknappheit nach sich. Die Hälfte der Menschheit ist unterernährt, nur 2o-22 % können sich jeden Tag satt essen. Die große Kinderzahl belastet sehr stark die Erziehungssysteme und letztlich birgt Übervölkerung die Gefahr der Gesellschaftsdestruktion.

Bei Mikroorganismen und auch bei den höheren Lebewesen folgt die Bevölkerungszahl unter zunächst optimalen Verhältnissen der Kurve einer Exponentialfunktion, um sich dann asymtotisch einem Maximum zu nähern. Bei Bakterien liegt diese Regression hauptsächlich an Nährsubstrat oder Sauerstoffmangel. Bei höheren Lebewesen spielen zahlreichere Faktoren eine Rolle.

An Versuchen mit Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden,

daß bei einer Übervölkerung des begrenzten Käfigraumes die Zuwachsrate plötzlich stagnierte. Dem scheint eine funktionelle, endogene Unfruchtbarkeit, hervorgerufen durch den Stress der dauernden körperlichen Berührung, zugrunde zu liegen.

Das Wachstum bzw. die Regression einer Population wird bestimmt durch das Verhältnis von Sterberate zur Geburtsrate. Durch die Zivilisation sowie hygienische und medizinische Maßnahmen werden Faktoren, die die Bevölkerung auf der Erde dezimierten, zurzeit ferngehalten. So erscheinen Seuchen in einem Ausmaß historischer Epidemien nicht mehr möglich. Die Säuglingssterblichkeit ist stark zurückgegangen, soziale Maßnahmen und die Geriatrie lassen den Menschen älter werden. Zurzeit wird also die Differenz zwischen den Geburten- und Sterbeziffern immer größer und damit nimmt die Zuwachsrate von Jahr zu Jahr rapide zu. Überläßt man die Entwicklung sich selbst, so wird früher oder später eine Selbstregelung die Zahl der lebenden Menschen begrenzen. Während in den sog. Entwicklungsländern der Ernährungszustand bei weiterem Wachstum der Einwohnerzahl sich weiter verschlechtern wird, liegt in den industrialisierten Ländern, die eine viel höhere Einwohnerzahl pro qkm aufweisen (1960: Südamerika 9 Einwohner pro qkm, Europa 135 Einwohner pro qkm), (HAUSER 1960), der limitierende Faktor vor allem in der Eigenvergiftung durch die industrielle Produktion. Der Mensch muß darum bei der Gestaltung seiner Zukunft aktiv eingreifen. Dabei ergeben sich folgende Konsequenzen:

c) Die Konsequenzen

Zunächst kann die Basis der Ernährung erweitert werden durch Rationalisierung und Steigerung der landwirtschaftlichen Produktion, gekoppelt mit einer Änderung der Infrastruktur der einzelnen Länder, besonders der sozialen Verhältnisse. Dennoch ist sicher, daß es durch Produktionssteigerung auf die Dauer nicht gelingen kann, mit dem immer schnelleren Bevölkerungswachstum Schritt zu halten. Es ist

also nötig, die Fruchtbarkeit bewußt zu regulieren, die Geburtenkontrolle als künstlichen Regulationsfaktor gegen Hunger, Krankheit und Kriege zu stellen. Nur die Verbindung von Produktionsentwicklung und Geburtenkontrolle hat eine Aussicht auf Erfolg, der Menschheit ein menschenwürdiges Dasein zu ermöglichen. Dazu ist es nötig, den Menschen über seine Zukunft aufzuklären und die Möglichkeiten der Geburtenkontrolle bei der Gestaltung der weiteren Zukunft darzustellen. Man muß dabei davon ausgehen, daß beim Menschen das Sexualverhalten als soziale Funktion in das Leben integriert ist und ein Triebverzicht darum nicht möglich ist.

Die Reproduktionskapazität des Menschen wird durch die Frau limitiert. Bei einer fertilen Zeit von 3o bis 35 Jahren können während rund 4oo Zyklen 4oo befruchtete Eier entstehen, doch muß man wohl eine maximale Zahl von 2o möglichen Geburten pro Frau annehmen. Wenn diese Zahl vielleicht einmal nötig war, um die Art Mensch nicht aussterben zu lassen, so darf sie heute nicht einmal annähernd erreicht werden, wenn eine Katastrophe vermieden werden soll.

Verschiedene Möglichkeiten zur Fertilitätskontrolle

Die Anwendung von Steroiden zur Kontrazeption hat sich in den zurückliegenden Jahren in den Industrieländern der westlichen Welt zur am weitesten verbreiteten Methode der Familienplanung entwickelt. Eine Lösung der weltweiten Probleme des Geburtenüberschusses mit den herkömmlichen oralen Kontrazeptiva hat sich aber gerade dort nicht herbeiführen lassen, wo das explosionsartige Wachstum bereits zu katastrophalen Zuständen geführt hat, hier ist besonders an die Situation in verschiedenen asiatischen Ländern zu denken. Man muß also konstatieren, daß eine Methode der Familienplanung, die die anstehenden Probleme lösen könnte, noch nicht existiert. Dies wird auch reflektiert durch die Vielfalt

der wissenschaftlichen Bemühungen, praktikable und akzeptable Methoden der Fertilitätskontrolle zu entwickeln.

Die zuerst von PINCUS entwickelten oralen Kontrazeptiva hemmen in den angewandten Dosierungen mit großer Sicherheit die Ovulation (MEARS). So entstand das Synonym "Ovulationshemmer", obwohl lange bekannt ist, daß die Ovulation keineswegs die einzige gestörte Sexualfunktion unter oralen Kontrazeptiva ist und daß deren antifertile Bedeutung sicher nicht zu vernachlässigen ist (siehe Diskussion), u.a. sind in diesem Zusammenhang Einflüsse auf den Eitransport, die Eiernährung, endometriale und embryonale Voraussetzungen der Nidation und die Corpus-luteum-Funktion zu nennen.

Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, alle wichtigen Aspekte der Hormonwirkungen auch nur zu streifen. In der vorliegenden Arbeit wird im wesentlichen ein Aspekt der weiblichen Reproduktionsphysiologie detailliert betrachtet: Die Befruchtung, insbesondere Physiologie und Pharmakologie der Cervix uteri.

Abb. 1 zeigt die vulnerablen Funktionen in Abhängigkeit vom weiblichen Sexualzyklus, soweit es sich um endokrin gesteuerte Mechanismen handelt. Unter den Symbolen Oe ist die Wirkung von Oestrogenen, unter P die von Progesteron, unter FSH die von Follikel-stimulierendem Hormon, unter LH die von luteinisierendem Hormon und unter HCG die von Humanchoriongonadotropin zu verstehen.

Wie aus dieser Tafel zu ersehen ist, ergeben sich drei Ansatzpunkte, in denen die verschiedenen Möglichkeiten der weiblichen Fertilitätskontrolle zusammengefaßt werden können:

1. Die Hemmung der Produktion von Gameten.
2. Die Hemmung der Vereinigung von Gameten, also die Hemmung der Befruchtung.
3. Die Störung der Entwicklung des befruchteten Eies (Abortive Wirkung).

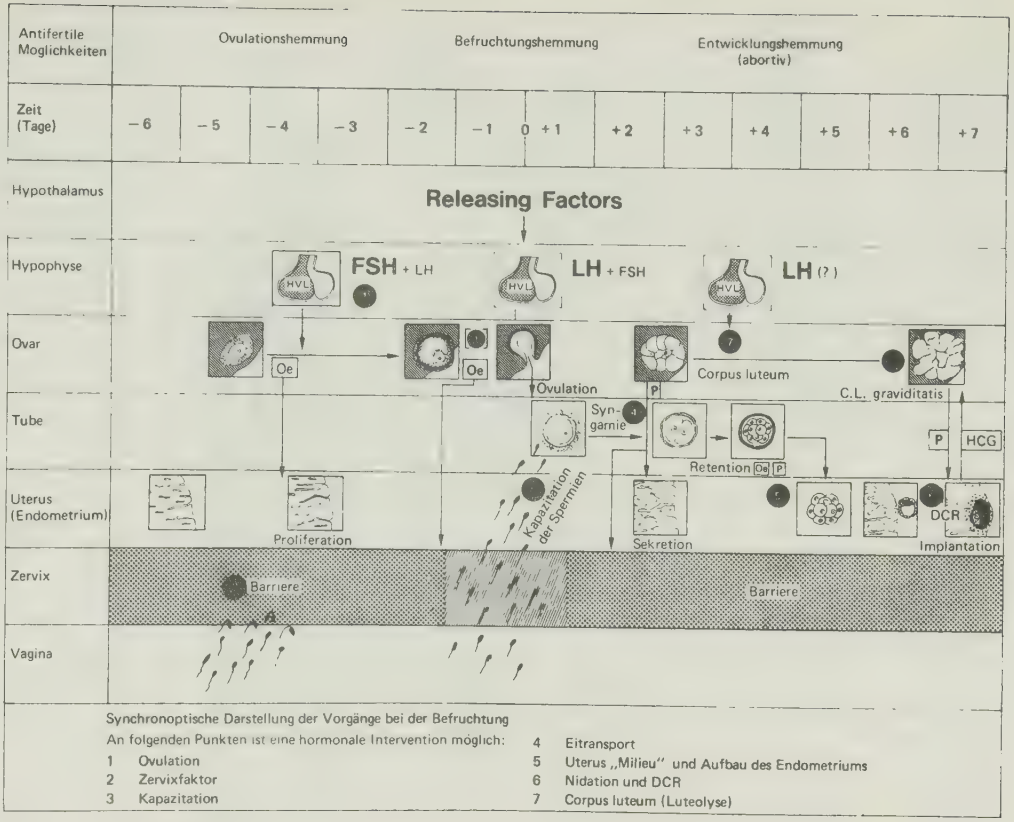

Antifertile Möglichkeiten
Ovulationshemmung
Befruchtungshemmung
Entwicklungshemmung (abortiv)
Zeit (Tage)
−6
−5
−4
−3
−2
−1
0
+1
+2
+3
+4
+5
+6
+7
Hypothalamus
Releasing Factors
Hypophyse
HVL
FSH + LH
LH + FSH
LH (?)
Ovar
Oe
Ovulation
P
Corpus luteum
C.L. graviditatis
Tube
Syn-garnie
Retention
Oe
P
P
HCG
Uterus (Endometrium)
Proliferation
Kapazitation der Spermien
Sekretion
DCR
Implantation
Zervix
Barriere
Barriere
Vagina
Synchronoptische Darstellung der Vorgänge bei der Befruchtung
An folgenden Punkten ist eine hormonale Intervention möglich:
1 Ovulation
2 Zervixfaktor
3 Kapazitation
4 Eitransport
5 Uterus „Milieu" und Aufbau des Endometriums
6 Nidation und DCR
7 Corpus luteum (Luteolyse)

Abb. 1

Es gibt natürlich auch Praktiken der männlichen und weiblichen Fertilitätskontrolle auf nicht hormonaler Basis, die z.B. Befruchtung bzw. Nidation verhindern. Um nur einige zu nennen: Coitus interruptus, Kondome, intrauterine Devices, Tubenligatur und Vasektomie. Ihre Bedeutung und Problematik soll hier nicht im Detail diskutiert werden (vergl. Abb. 2).

Analog zur Ovulationshemmung bei der Frau bietet sich beim Mann die hormonelle Sterilisierung an. Unter Gestagenen resultiert nach 3 1/2 Wochen eine Azoospermie, nach 6 Wochen eine Aspermie. Dabei wird ein Verlust von Libido und Potenz beobachtet und es tritt eine Atrophie der Testes ein. Nach Absetzen der Medikation wird Libido und Potenz schnell wieder hergestellt, doch dauert es 1o-11 Wochen, bis wieder bewegliche Spermien zu finden sind, nach 24-26 Wochen besteht wieder eine regelmäßige jedoch niedrige Produktion. Erst nach 8o Wochen scheint die Spermaproduktion wieder normal zu sein (HELLER et al. 1968). Bei der Verwendung von Androgenen zur antifertilen Medikation tritt zwar kein Libido- und Potenzverlust auf, doch ist es der synthetischen Chemie bis heute nicht gelungen, sehr potente, oral wirksame und dabei nicht toxische Androgene herzustellen.

Die beträchtliche Latenz antifertiler Wirkungen, was den Eintritt der Wirkung und deren Reversibilität betrifft, dürfte einer der Hauptgründe dafür sein, daß bisher Anstrengungen zur hormonalen Kontrolle der männlichen Fertilität nie über initiale Stadien hinaus gediehen sind.

Mechanismus	Methode	Zitat
Hemmung der Ovulation (nur hormonell)	Oestrogene	Gual
	Gestagene	Pincus; Rudel; Rock; Rice-Wray
	kombinierte Oestrogene - Gestagene	Mears Diczfalusy
Hemmung der Befruchtung	Antikörper gegen Spermien	Moghissi
	Tubenligatur, Pessar, Kondom, spermizide Substanzen	Sterchi
	Minipille (kontinuierliche Gestagene)	
	a) via Gametentransportstörung	Roland
	b) via Kapazitations-Beeinflussung	Chang; Ericsson
Hemmung der Eientwicklung	Volksabortiva (embryotoxisch?)	
	postkoitale kombinierte Oestrogene-Gestagene via Nidationshemmung	Jackson; Maqueo; Hammerstein
	postkoitale Oestrogene	
	a) via Beschleunigung des Eitransports	Morris McLean
	b) via Luteolyse	Menge
	IUD via Implantationsstörung	Marston; Kelly
	Prostaglandine	Karim
	a) via Luteolyse = keine Progesteronproduktion	McCracken
	b) via Wehenauslösung	Wiquist

Abb. 2 Verschiedene Möglichkeiten der weiblichen Fertilitätskontrolle.

Der Weg der Spermatozoe von der Ejakulation bis zur Syngamie (Abb. 4)

1. Die Passage der Spermien in und durch die Zervix:

a) Das vaginale Milieu:

Während bei vielen Säugern (so z.B. Schwein, Pferd und Hund) während des Coitus die Spermien direkt in das Uteruslumen ejakuliert werden, erfolgt beim Menschen wie auch beim Kaninchen, Rind und Schaf die Ejakulation in die Vagina. Gerade zum Zeitpunkt der Ovulation ist jedoch das vaginale Milieu beim Menschen besonders sauer (pH ~ 4,5) (MARCUS et al. 1963) und damit "unfreundlich" den Spermien gegenüber (MASTERS et al. 1961), die vorerst aber noch in dem schützenden Samenplasma eingebettet sind (BEDFORD 197o c).

Schon während der ersten Minuten nach dem Coitus verlassen beim Menschen Spermien den vaginalen pool und dringen in den Zervixkanal ein (SOBRERO und MAC LEOD 1962).

b) Der Zervikalschleim:

Durch den besonderen molekularen Aufbau des Zervikalschleims kann die Zervix eine Doppelfunktion erfüllen.

Erstens stellt sie bei den Spezies mit vaginaler Insemination eine Barriere für die ascendierenden Spermien und vaginales Sekret dar. Zweitens fungiert der Zervikalschleim als Spermienreservoir. Bei Untersuchungen am Menschen wurden noch 6 Tage nach einer vaginalen Insemination bewegliche Spermien in der Zervix gefunden (NICHOLSON 1965). Zur Zeit der Ovulation sind die Makromoleküle des Zervikalschleims in parallelfaserigen Schleimfilamenten mit dazwischenliegenden Flüssigkeitsspalten angeordnet (ODEBLAD 1968). Dieses Röhrensystem kann zumindest beim oestrischen Kaninchen zur Zeit der Ovulation nur von aktiv beweglichen Spermien überwunden werden (CARLETON u. FLOREY 1931, NOYES et al. 1958 a, WALTON 193o) (umstritten s. HARTMANN 1957). Das Samenplasma wird dabei wahrscheinlich vollständig abgestreift (BEDFORD 197o c).

In jeder anderen Phase des Zyklus und unter der Wirkung von exogen zugeführten Gestagenen sind die Schleimfilamente durch Mikrofasern vernetzt, zwischen die eine amorphe Grundsubstanz eingelagert ist (SINGER et al. 197o). Damit stellt die Zervix außerhalb des Ovulationstermins eine unüberwindbare Barriere für die Spermien dar (ELSTEIN 197o).

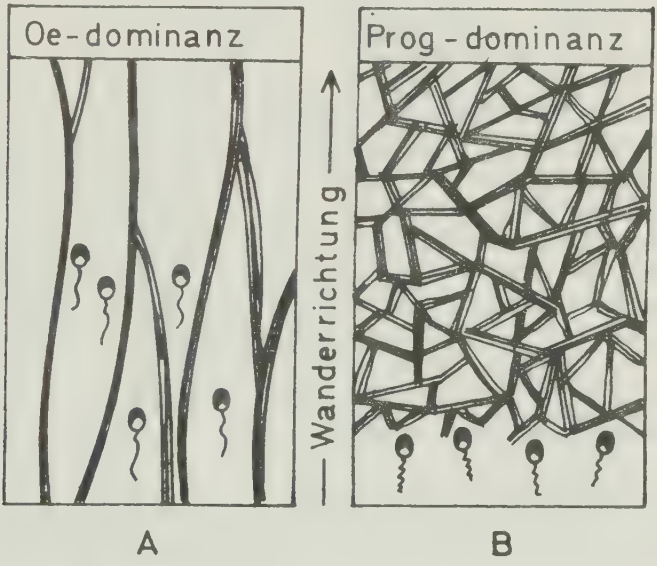


Abb. 3 Makromolekulare Struktur des Zervixschleims
A: Ausrichtung der Filamente zum Ovulationstermin
B: Netzbildung unter Gestagenen
(mod. nach ODEBLAD 1968)

Während in der Vagina des Kaninchens nach einer natürlichen Insemination bis zu 4oo Mio Spermien und darüber gezählt werden können, werden davon im Uterus nur noch 1 bis 2 Mio wiedergefunden (BEDFORD 197o a).

2. Der Transport im Uterus

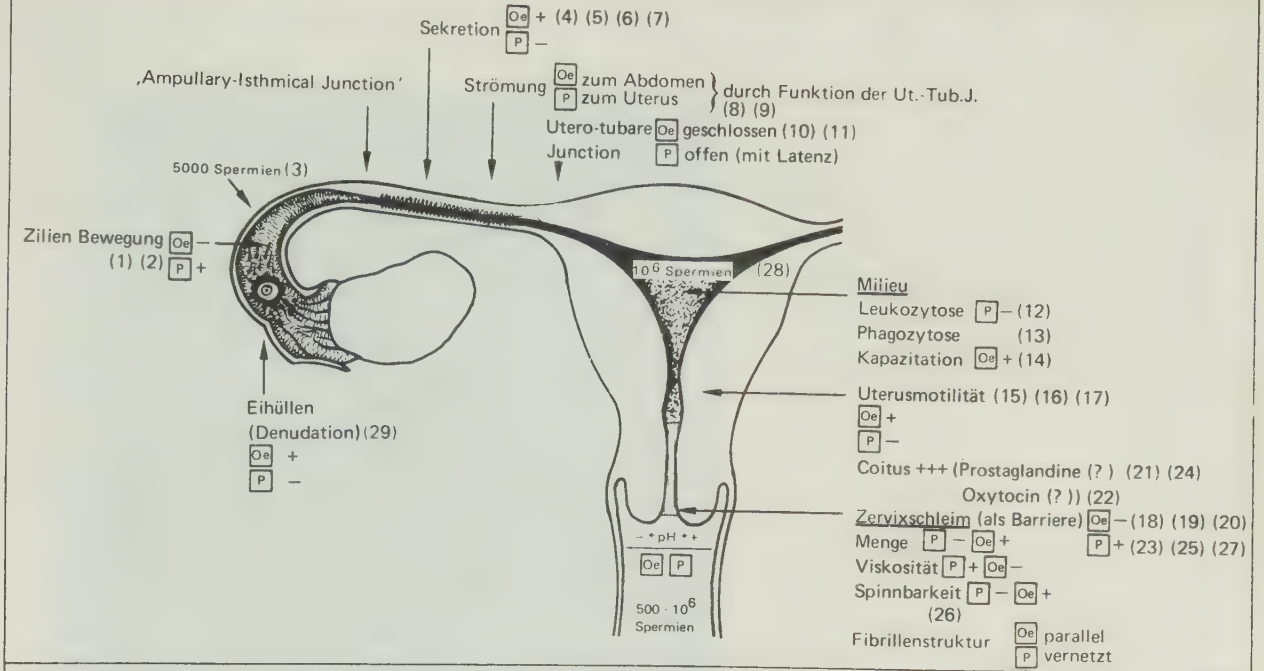
Untersuchungen am Schaf ergaben, daß Spermien in weniger als einer halben Stunde nach intravaginaler Insemination in der Ampulla tubae zu finden sind, also schneller als es durch die Eigenbeweglichkeit der Spermien möglich wäre (CARY 1936, MATTNER und BRADEN 1963). Darum wird von BEDFORD der Transport in eine anfängliche schnelle Phase und eine darauf folgende langsame Phase unterteilt (BEDFORD 197o c).

Der ersten Phase liegt hauptsächlich der passive Transport durch die gesteigerte Motilität des Myometriums, der zweiten Phase die eigene Vorwärtsbewegung der Spermatozoen zugrunde. Untersuchungen am Menschen lassen bezweifeln, daß die Spermien aus eigener Kraft die oberen Abschnitte des Uterus erreichen können (BICKERS 196o). In diesem Zusammenhang verdienen die intensiven Uteruskontraktionen beim menschlichen Coitus eine gewisse Beachtung (FOX et al. 197o).

3. Die utero-tubare Junktion

Nach der Auffassung verschiedener Autoren (CHANG 1951 b, BRADEN 1953) ist es eine wichtige Aufgabe des weiblichen Genitaltraktes, die Zahl der Spermien, die den Ort der Befruchtung erreichen, zu begrenzen. Die utero-tubare Junktion stellt dabei die zweite natürliche Barriere nach der Zervix uteri dar (MAC LEOD et al. 1955). Während im Uterus des Kaninchens noch 1-2 Mio Spermien gefunden werden können, erreichen nur ungefähr 5ooo die Tube und in der Ampulla tubae - also am Ort der Befruchtung - wurden nur noch 249 Spermien gezählt (BRADEN 1953). Es erreicht also ungefähr nur 1 von je 1 Mio ejakulierter Spermien den Ort der Befruchtung.

Untersuchungen verschiedener Autoren ergaben, daß bei progesteron-behandelten Kaninchen die Befruchtungsrate bei intrauteriner Insemination geringer war als bei vaginal inseminierten oestrischen Kontrolltieren (BOYARSKY et al. 1947,



Schema des weiblichen Genitaltraktes unter besonderer Berücksichtigung des Spermientransportes und dessen Beeinflussung durch Progesteron P und Östrogene Oe Die Daten beziehen sich z.T. auf den Menschen, z.T. auf Versuchstiere

Abb. 4

Zitatverzeichnis zu Abb. 4

(1) Borell et al. 1957
(2) Hafez 1962
(3) Chang 1951 b
(4) Koester 197o
(5) Carlson et al. 197o
(6) Black et al. 197o
(7) McDonald et al. 1969
(8) Chang 1967
(9) Chang et al. 1961
(1o) Black et al. 1958 u. 1959
(11) Gupta et al. 197o
(12) Howe 1967
(13) Bedford 197o c
(14) Chang 1958
(15) Kelly 1962
(16) Reynolds 193o und Reynolds et al. 1932
(17) Bickers 196o
(18) Roland 1952
(19) Cohen et al, 1952
(2o) Hartmann 1957
(21) Masters u. Johnson 196o
(22) Horne et al. 1962
(23) Nogales et al. 1957
(24) Rommer 1952
(25) Zanartu 1964
(26) Cohen et al. 1965
(27) Bergmann 1953
(28) Braden 1953
(29) Greenwald 1958

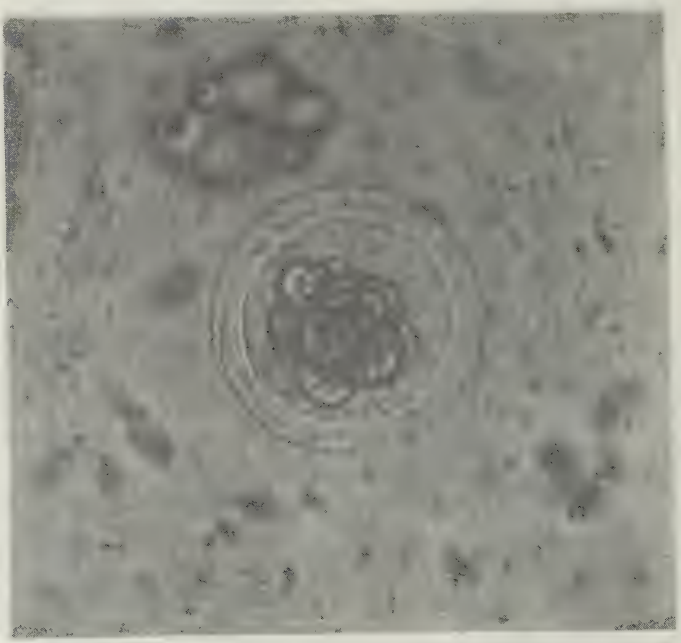


Abb. 5 Vitalaufnahme einer Kaninchen-Blastula im 16-Zellenstadium

MURPHEE et al. 1947, 1951, CHANG 1967). Das läßt vermuten (BEDFORD 197o c), daß eine Progesteron-Behandlung den Spermientransport durch die utero-tubare Junktion und vielleicht auch durch die Tube behindert.

4. Der Transport in der Tube

Hier können drei verschiedene Transportmechanismen unterschieden werden (BLACK und ASDELL 1958, 1959):

1) Ein schneller Transport durch die Aktivität der Ringmuskulatur des Eileiters,
2) die eigene Schwimmfähigkeit der Spermatozoen und
3) der Flüssigkeitsstrom in der Tube, der zum abdominalen Ende der Tube gerichtet ist und dabei die Spermatozoen mitträgt. Durch Oestrogene wird dieser Flüssigkeitsstrom durch gesteigerte Sekretion vermehrt, unter Progesteron stark vermindert und durch die Öffnung von funktionellen Sphinktersystemen eine Strömungsumkehr zum Uterus hin bewirkt (KOESTER 197o).

5. Die Befruchtung

a) Die akrosomale Reaktion (a.R.)

Unter der a.R. sind Veränderungen an dem führenden Teil des Spermienkopfes zu verstehen, die in unmittelbarer Nähe der Kumulus- und Koronazellmassen des Eies oder zwischen ihnen vor sich gehen und mit der Auflösung des Akrosoms einhergehen (BEDFORD 197o a).

Zuerst bilden sich zwischen der Zellplasmamembran und der äußeren Membran des Akrosoms Verbindungen, so daß ein Teil des Spermienkopfes wie mit Bläschen umhüllt aussieht, die sog. "vesiculation reaction" (BARROS et al. 1967). Dann geht die Zellplasmamembran zusammen mit der äußeren Akrosommembran verloren, so daß nun die innere Akrosommembran der

äußere und führende Teil ist (BEDFORD 197oc).Dabei werden akrosomale Enzyme freigesetzt, die den Verband der Kumulus- und Koronazellen, die das frisch ovulierte Ei noch umgeben, lösen können (AUSTIN und BISHOP 1958).

b) Die Penetration der Zona pellucida

Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen beim Kaninchen dringen die Spermien in einem bestimmten Winkel, und zwar tangential zur Oberfläche des Eies, in die Zona pellucida ein. Der Spermienschwanz stellt die vorwärtstreibende Kraft dar und durch seine hin- und herschlagende Bewegung "sägt" sich das Spermium mit seinem Perforatorium (marginal bulge), auf dem wahrscheinlich proteolytisch wirksame Enzyme fest verankert sind, einen Spalt in die Zona pellucida. Dieser Spalt, der auch noch zu erkennen ist, wenn das penetrierende Spermium ihn bereits verlassen hat, führt mehr oder weniger gebogen zum Vitellus (BEDFORD 197o a, AUSTIN 1951).

c) Der Kontakt des Spermiums mit dem Vitellus, die Inkorporation und Syngamie

Nach der Penetration der Zona pellucida nimmt das Spermium mit dem hinteren Teil des Kopfes Kontakt mit der Eiplasmamembran auf und stimuliert sie. Im Moment der Berührung von Ei und Spermium hört jede Bewegung des Spermienschwanzes auf (BEDFORD 197o c).

In der folgenden Inkorporation seines hinteren Kopfteiles, Halses und Schwanzes verlieren die Spermien ihre Plasmamembran (SZOLLOSI et al. 1961). Nachdem der Kopfteil in das Ei aufgenommen ist, folgt die Vorkernbildung, die Spindelfaserbildung und mit der Vereinigung der männlichen und weiblichen Elemente das Ende des Befruchtungsvorgangs.

d) Die Kapazitation

Im Jahre 1951 berichteten zwei Autoren unabhängig voneinander, daß sich die Spermien von fertilen Ratten (AUSTIN 1951) oder Kaninchen (CHANG 1951a)erst einige Stunden im

weiblichen Genitale aufhalten müssen, bevor sie die Zona pellucida durchdringen können. Seitdem konnten ähnliche Befunde auch bei anderen Säugetieren erhoben werden.

Wie aus der Tab. 6 zu ersehen ist, verhalten sich Uterus und Tube beim Kaninchen in bezug auf die Kapazitation unter dem Einfluß von Steroiden recht verschieden.

Kapazitationsorgan	Kapazitation	Zitat
I. Oestrisches Tier		
Uterus	in 1o-11 h	Bedford 197o b
Tube	in 1o-12 h	Adams u.Chang 1962
Uterus u. Tube	in 5- 6 h	Chang 1955 Austin u.Braden 1954 Adams u.Chang 1962
II. Ovariektomiert		
Uterus	stark verlangsamt	Bedford 197o b
Tube	gering verlangsamt	Soupart 1967 Noyes et al. 1958 b
III. Oe-dominanz		
Uterus	extrem begünstigt	Bedford 197o b
Tube	begünstigt	
IV. Prog.-dominanz		
Uterus	absolute Hemmung	Hamner et al. 1968 Chang 1958
Tube	in 12 h	Bedford 197o b Chang 1967

Tab. 6 Kapazitationsdauer in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Kaninchengenitale und unter Einwirkung von Steroiden.

I. Kaninchenspermien können, wenn sie sich erst im Uterus und dann in der Tube aufhalten, innerhalb von 5-6 Stunden kapazitiert werden. Diese Zeit ist kürzer als die, die dafür im Uterus oder in der Tube allein nötig ist (vergl. Tab. 6). Als Erklärung bietet sich ein Synergismus von zwei Faktoren an, von denen der eine vom Uterus, der andere von der Tube in größerem Maße abgegeben wird (BEDFORD 197o a). Wenn

die utero-tubare Junktion experimentell unterbunden wird und dann kein Tubensekret in den Uterus übertreten kann, verlängert sich die Zeit der uterinen Kapazitation auf 15 Stunden (BEDFORD 1969).

II. und III. Durch Oestrogene wird die Kapazitation in beiden Organen begünstigt, besonders im Uterus. Aber auch im ovarektomierten Tier bleibt die Kapazitationsfähigkeit beider Organe erhalten, obwohl die dafür benötigte Zeit im Uterus erheblich verlängert wird (= 2o Stunden).

Das Milieu des Uterus scheint also generell in einem stärkeren Ausmaß einer hormonalen Kontrolle zu unterstehen als es im Eileiter der Fall ist.

IV. Durch Progesterongabe verliert der Uterus die Kapazitationsfähigkeit, während sie in der Tube erhalten bleibt (CHANG 1958).

Das Wesen der Kapazitation

Ganz allgemein kann bei BEDFORD zur Definition der Kapazitation nachgelesen werden: "It is likely, that capacitation prepares or sensitizes mammalian sperm in some way, enabling them to undergo the acrosome reaction in response to a specific stimulus" (BEDFORD, Biol.Reprod. Suppl. 2, 197o, S. 145).

Und ERICSSON formulierte so: "... capacitation is defined as the physiological and biochemical change that spermatozoa undergo which allows for penetration and fertilization of ova" (ERICSSON, J.Reprod.Fertil. Suppl. 2, 1967, S. 65).

Von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Kapazitation war eine Beobachtung von CHANG: Von ihm wurde im Jahre 1957 der Dekapazitationsfaktor (DF) im Samenplasma entdeckt und beschrieben.

Im Uterus kapazitierte Kaninchenspermien wurden durch erneuten Kontakt mit Samenplasma reversibel wieder befruchtungsunfähig (CHANG 1957). DF-Aktivität ist auch im Samenplasma des Menschen nachgewiesen (PINSKER und WILLIAMS 1968).

Zu den physikalischen und chemischen Charakteristika von DF kann Folgendes gesagt werden:
Durch Ultrazentrifugierung kann die DF-Aktivität aus dem Samenplasma entfernt werden (BEDFORD und CHANG 1962).
Durch Pronase wird sie nicht zerstört (WEINMANN und WILLIAMS 1964), jedoch durch Beta-Amylase (KIRTON und HAFS 1965). Auch wurde beschrieben, daß Samenplasma Proteinase hemmende Faktoren besitzt (HAENDLE et al. 1965), die auf das Akrosom übergehen und dort verschiedene Enzyme bei frisch ejakulierten Spermien hemmen (ZANEFELD et al. 1969). Die Entfernung bestimmter enzymhemmender Aktivitäten mag also ein Teilfaktor oder sogar den Hauptmechanismus bei der Kapazitation darstellen (ZANEFELD 1969).

Die "Oberflächentheorie" des DF
DF scheint eine besondere Affinität zur Spermienoberfläche zu haben, denn gegen bestimmte Komponenten des Samenplasmas gerichtete Antikörper reagieren auch mit ejakulierten Spermien, nicht aber mit den Spermien im Hoden (WEIL 196o). 1969 konnte festgestellt werden, daß ein Glykoprotein vom Molekulargewicht 17o ooo alle Eigenschaften in sich vereint: Die Reaktionsfähigkeit mit der Spermienoberfläche, die Fähigkeit, Antikörper gegen die Spermienoberfläche zu erzeugen und die Aktivitäten von DF (HUNTER et al. 1969). Während der Kapazitation sollen nun Veränderungen im Kohlehydratanteil dieses Glykoproteins die Stellen auf der Oberfläche der Spermien freigeben, die mit der mukoprotein-ähnlichen Substanz der Zona pellucida reagieren (HUNTER et al. 1969) und gegebenenfalls

die akrosomale Reaktion auslösen.

Die Oberfläche von ejakulierten, nicht kapazitierten Spermien läßt sich durch Tetrazykline markieren, die dort durch ihre Fluoreszenz leicht nachzuweisen sind. Während des Kapazitationsvorganges werden diese Tetrazykline von der Oberfläche des Spermiums abgestoßen, so daß sie bei kapazitierten Spermien nicht mehr nachgewiesen werden können (ERICSSON 1967 a, b, 197o).

"Zervixfaktor" und "Kapazitation" - neue Angriffspunkte der Kontrazeption?

In der Anwendung der oralen Kontrazeptiva, die im wesentlichen die Ovulation hemmen, wird heute die sicherste Methode der weiblichen Fertilitätskontrolle gesehen, doch müssen bei ihrer Anwendung auch unerwünschte Wirkungen in Kauf genommen werden (Literatur bei PLOTZ 197o). Die Hemmung der Ovulation stellt zwar die erwünschte Wirkung oraler Kontrazeptiva dar, effektive Kontrazeption ist aber auch über andere antifertile Mechanismen denkbar, ohne daß die Ovulation notwendigerweise gehemmt wäre, z.B. durch Hemmung der Befruchtung. Im Idealfall würde dann der Eisprung und damit der physiologische Ablauf des Zyklus der Frau erhalten bleiben.

Als vulnerabele Mechanismen verdienen in diesem Zusammenhang die oben dargestellte Sperrfunktion der Zervix und die Kapazitation von Spermien im Uterus und deren Endokrinologie und Pharmakologie ganz besondere Beachtung.

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, eine Testmethode zu entwickeln, bei der es möglich ist, die befruchtungshemmende Wirkung von verschiedenen hormonal-wirksamen Substanzen zu untersuchen.

MATERIAL und METHODEN

1. Allgemeine Vorbemerkungen

Um unter allen experimentellen Verhältnissen reproduzierbare Versuchsbedingungen zu haben, waren folgende Voraussetzungen unter anderem nötig: Es mußte möglich sein, ausreichende Mengen an frischem Sperma zu gewinnen. Beim weiblichen Tier mußte eine Ovulation zu einem bestimmten Zeitpunkt sicher ausgelöst werden können. Eine künstliche Besamungstechnik mußte entwickelt werden. Eizellen mußten aus dem weiblichen Genitaltrakt gewonnen und dann beurteilt werden.

Aus verschiedenen methodischen Gründen wurde als Versuchstier das Kaninchen gewählt.

a) Weibliches Tier

1) Die Ejakulation erfolgt wie beim Menschen intravaginal (im Gegensatz zu Ratte und Hamster). Damit stellt wie beim Menschen die Zervix die erste Barriere für die Spermien dar. Da das rechte und linke Uterushorn je eine eigene Zervix besitzen, können gut Halbseitenversuche durchgeführt werden.

2) Das Endometrium reflektiert den hormonalen Status der Tiere besser als bei der Ratte.

3) Eine Ovulation bzw. Superovulation ist jederzeit auszulösen.

4) Eileiter und Uteri haben zu Operationen die genügende Größe und die Tuben sind leicht zu spülen.

b) Männliches Tier

Mit einer künstlichen Vagina ist leicht und in genügender Menge Sperma zu erhalten.

2. Tiermaterial

Als weibliche Tiere wurden 179 juvenile, virginelle Hasenkaninchen verwandt, ohne darauf zu achten, ob sie sich im Oestrus oder Anoestrus befanden. Sie wurden in Einzelboxen bei Wasser und Trockenpressfutter ad Libitum gehalten. Ihr Körpergewicht betrug bei Versuchsbeginn mindestens 2,3 kg, bei einem Alter von 13-14 Wochen.

Als männliche Tiere standen 12 Rammler verschiedener Rassen mit erwiesener Fertilität zur Verfügung, die einzeln in grossen Holzkäfigen bei frischem Salat, Mohrrüben, Trockenpressfutter, Heu und Hafer gehalten wurden.

Der Raum war klimatisiert, die Beleuchtung zyklisch - 14 Stunden hell und 1o Stunden dunkel.

3. Versuchsanordnung

Die verschiedenen Versuche wurden vor allem in den Monaten Oktober bis Januar vorgenommen. Die Versuchsanordnung soll anhand des folgenden Schemas erläutert werden (Abb. 7).

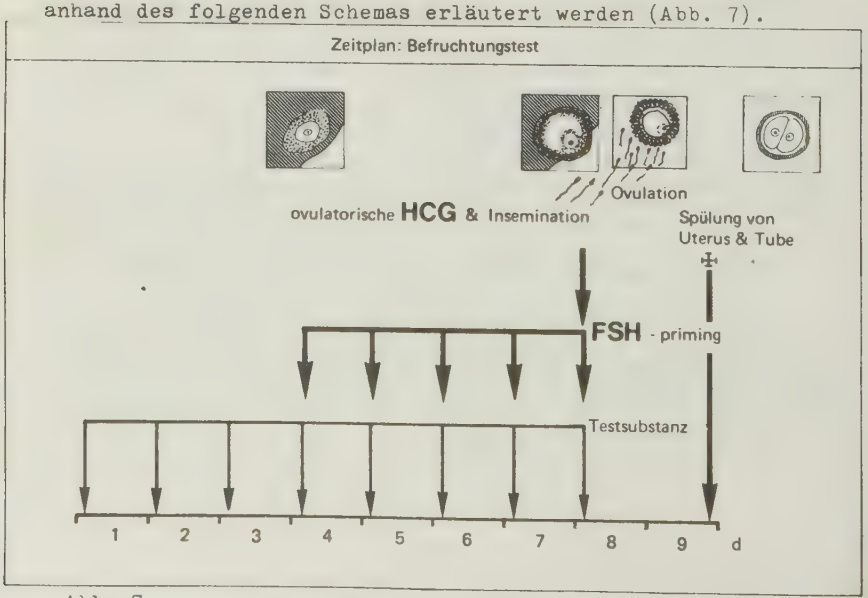


Abb. 7

Die weiblichen Tiere wurden über verschiedene Intervalle mit Progesteron s.c. vorbehandelt(s.-> P). Beginnend mit dem 4. Tag vor Versuchsende wurde zunächst FSH s.c. (s. -> FSH) injiziert und am frühen Morgen (7 Uhr) des letzten Behandlungstages durch eine einmalige i.v. Injektion von HCG und FSH die Ovulation ausgelöst. Anschließend wurde sofort die künstliche Insemination durchgeführt. Am späten Nachmittag des darauffolgenden Tages, frühestens 34 Stunden nach der Ovulationsauslösung, wurden die Tiere getötet, Uteri und Tuben präpariert, gespült und darin enthaltene Eier mikroskopisch untersucht. Als Kontrollgruppe wurden Tiere der einzelnen Tötungstermine zusammengefaßt, die nicht mit Progesteron vorbehandelt worden waren. Im Folgenden soll auf die einzelnen Abschnitte der Versuchsanordnung genau eingegangen werden.

a) Medikation

Die Tagesdosis von Progesteron wurde in 1 ml Sesamöl gelöst und an jedem Behandlungstag vormittags s.c. unter die Nackenhaut injiziert.

b) Superovulation

Im Gegensatz zu Mensch, Ratte, Hamster, Maus usw. ovuliert das Kaninchen nicht spontan. Beim weiblichen Tier wird normalerweise durch den Stimulus des Koitus - via LH-release aus der Hypophyse - die Ovulation ausgelöst (s. auch FOX 1968). Entsprechend läßt sich schon durch eine einmalige i.v. LH-Injektion (HCG oder PMS) eine Ovulation auslösen, doch ist diese Methode nicht völlig sicher und die Zahl der Eier schwankt zwischen 2 und 11 pro Tier (FOX et al. 1968 und eigene Beobachtungen).

Schon 1940 gelang es durch Vorbehandlung (priming) von 6 Monate alten Kaninchen mit Extrakten aus Pferdehypophysen und anschließender Injektion mit Extrakten aus dem Harn schwangerer Stuten,Ovulationen mit maximalen Eizahlen von 80 pro Tier zu induzieren (PINCUS 1940). Durch unsere Ver-

suchsanordnung konnten durchschnittlich 35 Ova pro Kaninchen erhalten werden (vergl. FORSTER et al. 1938) (siehe Abb. 8).

Dazu wurde den weiblichen Tieren 4 Tage lang vormittags o,33 mg Schafs-FSH (Schering-Charge 187 b) gelöst in 1 ml 2o %iger Kollidon- und o,9 %iger NaCl-Lösung s.c. unter die Nackenhaut gespritzt. Am Morgen des 5. Tages erhielten die 6o IE HCG (Schering-Charge o8o) zusammen mit o,25 mg Schafs-FSH gelöst in je 1 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Ohrrandvene injiziert.

Nach Erfahrung von HARPER beginnt die Ovulation von Ova ca. 1o Stunden nach der terminalen LH- (bzw. HCG-) Injektion. Bei der Superovulation zieht sich dieser Prozeß über mehrere Stunden hin, nach 14 Stunden jedoch kann die Ovulation als abgeschlossen angesehen werden (HARPER 1961, 1963). Die Zahl der bei Stunde 34 nach der HCG-Injektion wiedergefundenen Eier in den verschiedenen Gruppen ist in Tabelle 8 zusammengestellt.

	N (Tiere)	N (Eier)	Eier/Tier (min-max.)
Kontrollen (Superovul.)	51	1695	33 (1 - 91)
Progesteron-behandelt	128	4533	35 (o^+ - 147)
Zusammen	179	6228	35 (o^+ - 147)

Tab. 8 ($^+$Ein Tier hatte nicht ovuliert)

c) Spermagewinnung

Die Kaninchenböcke sprangen auf ein Kaninchenfell, das locker auf den mit einem Schützer bewehrten Unterarm gelegt wurde (Abb. 9). Zur Duftmarkierung wurde das Fell zwischen den Versuchen an den Käfigen der weiblichen Kaninchen aufbewahrt. Die Ejakulation erfolgte in einer künstlichen Vagina. Diese besteht aus einem eröffneten Gummifingerling, der von

einem mit 4o - 5o° Celsius heißem Wassermantel umgeben war. Niedrigere Temperaturen sind unbrauchbar. Die Auffangbehälter fungierten Glashütchen, die durch ihre besondere Form einerseits auch bei Schräghaltung ein Auslaufen der Spermaflüssigkeit verhinderten, zum anderen einen spitzen Boden hatten, um das vollständige Aufsaugen der Flüssigkeit zu ermöglichen. (s. Abb. 1o).

Abb. 9 Die Spermagewinnung

Abb. 1o Utensilien zur Spermagewinnung Klassifizierung und Applikation

d) Qualifizierung und Weiterbehandlung der gewonnenen Ejakulate.

Ein Tröpfchen jedes so gewonnenen Ejakulats wurde auf einen Objektträger gebracnt und dessen Qualität ohne Deckglas unter dem Mikroskop beurteilt und in den Versuchsprotokollen mit ++ = sehr gut bewegliche, + = z.T. bewegliche und o = gar nicht oder kaum bewegliche Spermien klassifiziert. Nur sehr gut bewegliche Spermien (++) wurden weiter verwandt. Die einzelnen Ejakulate wurden gepoolt (BEATTY 196o). Die Gesamtspermamenge von mindestens 2 ml wurde mit o,5 ml Plasmaexpander Haemacel R verdünnt, in dem 2o ooo IE Penicillin und 2o mg Streptomycin gelöst waren, um das gleiche Ejakulat im Bedarfsfall auch für eine intrauterine Insemination verwenden zu können.

In einer roten Blutmischpipette wurde bis 1 (= o,o1 ml) die Spermasuspension aufgezogen. Der verdünnte Inhalt der Pipette wurde mindestens 3o Sekunden auf einem Schüttler gemischt, die ersten Tropfen wurden verworfen, und dann wurde von dem Rest eine Schilling-Kreuznetzzählkammer (Höhe 1/10 mm) gefüllt. Nach dem Absetzenlassen wurden bei mittlerer Vergrößerung (12o mal) 25 große Quadrate à 1/25 mm^2 ausgezählt (vergl. Abb. 11). Diese Zahl gibt die Spermienkonzentration in $1o^6$/ml an. Sie lag im allgemeinen bei 15o-22o x $1o^6$ Spermien pro ml.

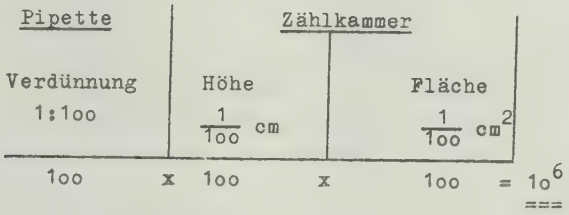


Abb. 11 Umrechnungsfaktor für 1 Einheit in der Zählkammer

e) Künstliche Insemination

Unmittelbar nach der ovulationsauslösenden LH-Dosis wurde ein Kaninchen zunächst im Spanischen Kragen fixiert, auf den Rücken gedreht und dann ein leicht gebogenes Glasrohr (4 mm lichtes Lumen) in die Vagina eingeführt. Das Glasrohr dient wiederum als Führung für einen 7 cm langen Nélatonkatheter (Ch 12). Durch das Glasrohr wird vermieden, daß das Ende des flexibelen Gummikatheters in der Harnblase eingeführt wird. In den Katheter wurden im allgemeinen o,2 ml, mindestens jedoch o,15 ml, mit einem Gesamtgehalt von 4o-5o Mio Spermien mit einer Tuberkulinspritze injiziert. Sofort wurde der Katheter mit o,4 ml Hämazellösung nachgespült, um zu vermeiden, daß ein Teil der applizierten Spermamenge im Katheter zurückblieb.

4. Versuchsauswertung

34 - 38 Stunden nach der Ovulationsauslösung wurden die Tiere mit o,4 g Hexobarbital-Natrium in 2,5 ml Wasser i.v. getötet. Durch den relativ späten Termin der Untersuchung sollte erreicht werden, daß auch das zuletzt ovulierte Ei geteilt sein konnte, sofern es befruchtet war (vgl. VARIAN et al. 1967).

Nach medialem Bauchschnitt wurde jede Hälfte des Reproduktionstraktes, also Uterus, Tube und Ovar, am Meso herausgeschnitten und bis zur Präparation in 37° Celsius warmer physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Tube und Uterus wurden dann von den Resten des Meso befreit und so gestreckt. Anschließend wurden sie an der utero-tubaren Junktion getrennt. Die Tube wurde vom uterinen Ende in Richtung Infundibulum mit 2 x 1 ml 37° Celsius warmer physiologischer Kochsalzlösung durchspült und die Spülflüssigkeit in 2 Uhrgläsern von 6 cm Durchmesser aufgefangen. Auch der Uterus wurde vom tubaren Ende aus mit 2 x 1 ml gespült.

Um eine Aussage über die befruchteten Eier zu bekommen, wurden unter dem Durchlichtmikroskop bei ungefähr 2o-facher Vergrößerung die geteilten und ungeteilten Eier gezählt. Regelmäßig geteilte Eier wurden dabei als befruchtete angesehen.

Zur histologischen Untersuchung wurden die Uteri nach dem Spülen in 1o %igem Formalin eingelegt, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt. Die Beurteilung der endometrialen Veränderungen erfolgte nach der McPhail-Skala (MPI) (Abb. 12), wobei von o (= oestrogenvorbehandelt) bis + 4 (stärkste gestagene Wirkung) gezählt wurde (McPHAIL 1934). Da manchmal eine Entscheidung für einen glatten Wert nicht möglich war, wurden die Zwischenwerte o,5; 1,5; 2,5 und 3,5 eingeführt. In der Tabelle erscheint das arithmetische Mittel der Einzelwerte der Tiere jeder Gruppe.

Da für die Werte der McPhail-Skala (MPI) eine Normalverteilung

Abb. 12 Die McPhail-Skala

nicht gegeben ist, wurde bewußt auf eine Angabe der Standardabweichung verzichtet. Die Signifikanz wurde mit dem U-Test bestimmt.

In den folgenden Tabellen und graphischen Darstellungen wurden jeweils zwei verschiedene Parameter für die Befruchtungshemmung dargestellt:

1. Der Prozentsatz der Tiere mit befruchteten Ova, um eine Aussage über die absolute Befruchtungshemmung einer bestimmten Dosierung oder Behandlungsdauer machen zu können,
2. der Prozentsatz der befruchteten Eier. Um bei den Tieren mit befruchteten Eiern die relative Verminderung der Fruchtbarkeit unter einer bestimmten Medikation auszuwerten, wurde die Signifikanz von Unterschieden im Vergleich zu Kontrollen unter Zuhilfenahme der Probitanalyse geprüft.

ERGEBNISSE

A) Die Befruchtung bei superovulierten künstlich inseminierten Tieren (Kontrollen)

In dieser Gruppe sind alle Kontrolltiere verschiedener Tötungstermine zusammengefaßt. Von insgesamt 51 Tieren hatten 47 (= 92 %) befruchtete Eier und von den insgesamt bei Kontrollen gefundenen 1695 Eiern waren 1148 (= 68 %) geteilt. (Tab. 14).

Das Endometrium zeigte generell das Stadium o, das bedeutet den Wert, der nach Oestrogenvorbehandlung zu finden ist. Nur bei 4 Tieren von 51 waren Anzeichen einer geringen Progesteronwirkung nachweisbar (Stadium 2).

B) Die Wirkung von Progesteron auf Befruchtung und Endometrium

1. Die Abhängigkeit von der Behandlungsdauer bei konstanter Progesteron-Dosis (3,o mg s.c.)

a) Die Befruchtung

67 Tiere wurden verschieden lange mit 3 mg Progesteron/die s.c. behandelt. Die längste Behandlungsdauer vor der Ovulationsauslösung waren 213 Tage (d.h. ungefähr 7 Monate), die kürzeste Behandlungsdauer mit Progesteron betrug 2 Tage. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 und der graphischen Darstellung 13 aufgeführt (Tag o = Kontrollen).

Wie aus der Kurve zu ersehen ist, sinkt sowohl die Rate der Tiere mit befruchteten Eiern, als auch die der befruchteten Eier überhaupt, signifikant ($p < o,o5$) zwischen den Behandlungslängen 4 und 6 Tage bei gleicher Progesterondosis (Tab. 14). In der Gruppe mit 8-tägiger Progesteron-Behandlung hatten von 15 Tieren nur 2 einzelne befruchtete Eizellen, von 376 Eiern waren nur 6 geteilt. Eine Vorbehandlung mit Progesteron von 12 und 3o Tagen verhinderte die Befruchtung bei allen Tieren vollständig. Nach noch längeren Behandlungszeiten bleibt der Progesteroneffekt nicht sicher erhalten. So hatten nach 63 Behandlungstagen von 5 Tieren 1 befruchtete Eier, von 237 Eiern waren 7 befruchtet (nicht signifikant). Nach 213 Tagen waren praktisch Verhältnisse wie bei den Kontrollen erreicht - soweit man bei der geringen Tierzahl solche Aussagen machen kann (3 von 4 Tieren hatten befruchtete Eier, 56 von 76 Eiern waren geteilt).

Zusammenfassung: Bei täglicher Applikation von 3,o mg Progesteron/die s.c. tritt eine maximale Hemmung der Befruchtung in unserem Versuchsmodell erst nach 12 Tagen Behandlung ein, ein besonders scharfes Abknicken der Befruchtungsrate ist zwischen dem 5. und 6. Tag zu beobachten. Diese Hemmwirkung zeigt sich auch bei ausgedehnterer Vorbehandlung. Sie kann anscheinend nicht ad infinitum aufrecht erhalten werden.

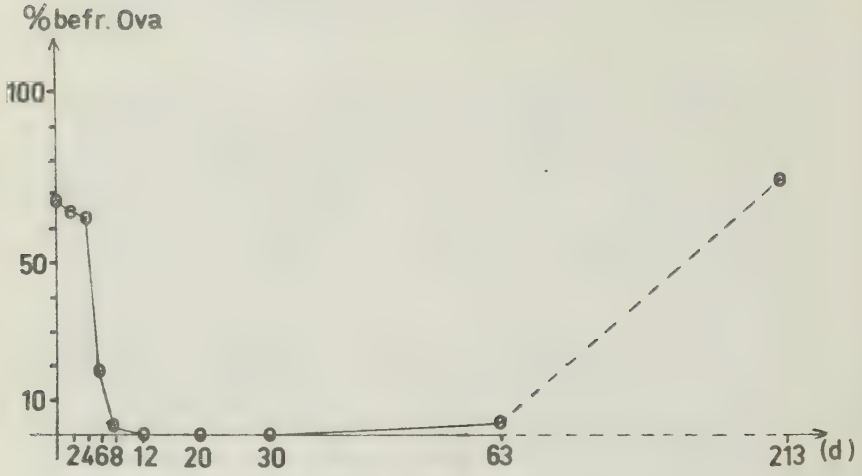


Abb. 13 Befruchtungshemmung nach verschiedenen Progesteron-Behandlungszeiten

Dauer (dies)	Tiere			Eier			Eier/Tier
	N(ges)	N(befr)	%	N(ges)	N(befr)	%	
Kontr	51	47	92	1695	1148	68 (65-7o)	33
2	13	11	85	415	271	65 (61-7o)	32
4	14	1o	71	46o	292	63 (59-68)	33
6	6	1	17	17o	331	18 (13-25)	28
8	15	2	13	376	6	2 (1- 3)	25
12	5	o	o	191	o	o (o- 2)	38
2o	6	o	o	172	o	o (o- 2)	2
3o	6	o	o	422	o	o (o- 1)	7o
63	5	1	2o	237	7	3 (1- 6)	47
213	4	3	75	76	56	74 (62-83)	19

(...): 95 %-Vertrauensbereich für den wahren Anteilswert

Tab. 14 Befruchtungshemmung nach verschiedenen Progesteron-Behandlungszeiten

b) Das Endometrium

Um eine Verbindung zwischen der morphologischen Manifestation und den funktionellen Veränderungen einer Progesteron-Behandlung zu schaffen, wurden 2 Parameter miteinander verglichen: 1. Der Prozentsatz der befruchteten Eier in Relation zur Medikation und zum 2. der McPhail Index in Relation zur Medikation.

Noch bevor die Befruchtungsraten zwischen den Behandlungslängen 4 und 6 Tage signifikant sinken ($p < o,o5$), steigt der McPhail Index (MPI) zwischen den Behandlungslängen 2 und 4 Tage von o,4 auf 2,6 an. Nach 12 Tagen Progesteron-Behandlung hat er mit 3,8 den höchsten Wert dieser Kurve erreicht, gleichzeitig ist die Befruchtungsrate auf o % gesunken. Nach längerer Progesteron-Behandlung (3o d, 63 d und 213 d) sinkt der McPhail Index wieder auf Werte um 2 ab (Abb. 15 und Tab. 16).

Hier muß erwähnt werden, daß eine Beurteilung der endometrialen Veränderung nach monatelanger Progesteron-Behandlung nicht mehr regelrecht nach der McPhail Skala vorgenommen werden konnte, da das Endometrium und Myometrium Veränderungen zeigten, die sich von der normalen gestageninduzierten Endometrium-Transformation erheblich unterscheiden. So wird, um einige Veränderungen zu nennen, das Endometrium z.T zystisch oder atrophisch. Gleichzeitig nimmt die Wandstärke der Uterusmuskulatur zu, sie hypertrophiert, so daß sich das Verhältnis von Myometrium zu Endometrium zugunsten des Myometriums verschiebt.

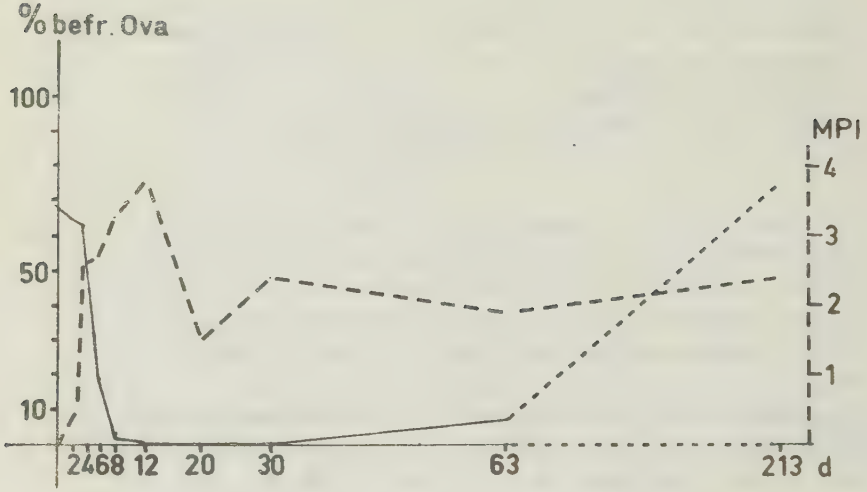


Abb. 15 Befruchtungshemmung und Endometriumtransformation

Prog.-Behandlungs-dauer (d) (3,o mg/d)	Befr.-Hemmung (% befr.Eier)	Endometrium (McPhail I)
Kontrolle	68	o
2	65	o,4
4	63	2,6
6	18	2,7
8	2	3,3
12	o	3,8
2o	o	1,5
3o	o	2,4
63	7	1,9
213	74	2,3

Tab. 16 Befruchtungshemmung und Endometriumtransformation

2. Die Abhängigkeit von der Dosis

a) Die Befruchtung

Aus dem unter (1.) beschriebenen Versuch geht hervor, daß erst nach einer 8-tägigen Progesteron-Behandlung mit 3 mg s.c./die die Verhältnisse für die Befruchtung extrem ungünstig sind und eine Variation nicht mehr zu beobachten ist. Um die Dosisabhängigkeit des Hemmeffektes zu bestimmen, wurden 6 Gruppen von Tieren 8 Tage lang mit verschiedenen Dosierungen von Progesteron behandelt (Tab. 17). Bei den niedrigen Dosierungen (o,o1 bis o,o3 mg) lag der Prozentsatz an befruchteten Eiern signifikant über den der Kontrollen ($p < o,o5$). Bei o,o3 mg z.B. hatten von 6 Tieren alle befruchtete Eier (1oo %), von 266 Eiern waren 181 (8o %) befruchtet.

Bei einer Steigerung der Progesterondosis von o,3 mg auf 1,o mg pro Tier und Tag sinkt der Prozentsatz an befruchteten Eiern abrupt ab ($p < o,o5$).

1,o mg und 3,o mg Progesteron bewirken bei nachfolgender Superovulation und Insemination eine maximale Befruchtungshemmung.

Zusammenfassung: Geringe Progesterondosen wirken steigernd auf die Befruchtungsrate, höhere Dosierungen (1,o mg/die) erwirken eine totale Befruchtungshemmung (Abb. 18).

Dosis (mg/d)	Tiere			Eier			Eier/Tier
	N(ges)	N(befr)	%	N(ges)	N(befr)	%	
Kontr.	51	47	92	1695	1148	68 (65-7o)	33
3,o	15	2	13	376	6	2 (1- 3)	25
1,o	6	1	17	383	2	1 (o- 2)	64
o,3	8	8	1oo	395	244	62 (57-66)	49
o,1	1o	9	9o	191	127	66 (6o-73)	19
o,o3	6	6	1oo	226	181	8o (74-85)	38
o,o1	3	3	1oo	129	112	82 (8o-92)	43

(...): 95 %-Vertrauensbereich für den wahren Anteilswert

Tab. 17 Befruchtungshemmung nach verschiedenen Progesterondosen über 8 Tage

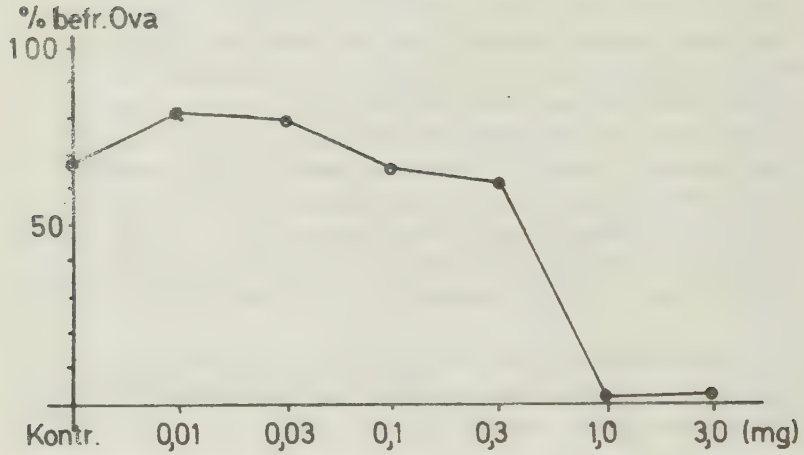


Abb. 18 Befruchtungshemmung nach verschiedenen Progesterondosen

b) Das Endometrium

Wie die Abbildung 19 zeigt, sind die Kurven der McPhail Werte und der Befruchtungsraten genau gegenläufig, d.h. die Dosierung, die die Befruchtungswerte sinken ließ (1,o mg), führte gleichzeitig zu einem Anstieg des McPhail Index.

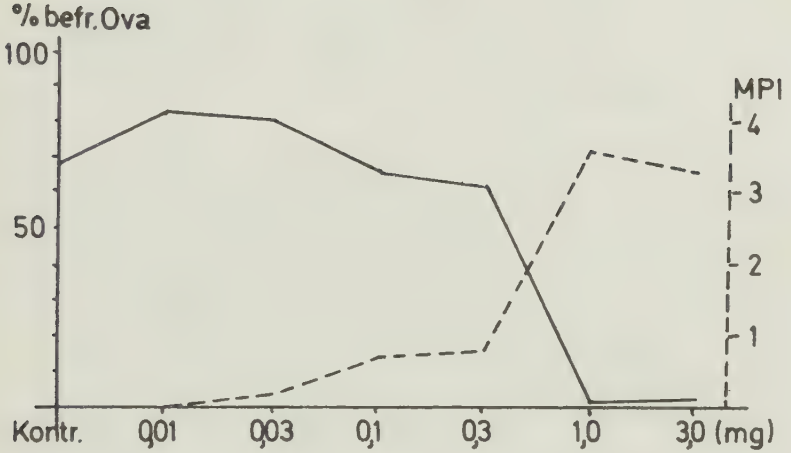


Abb. 19 Dosisabhängigkeit der Befruchtungshemmung und Endometriumtransformation

Prog.-Dosis (mg/d) über 8 Tage	Befr.-Hemmung (% befr. Eier)	Endometrium (McPhail I)
3,o	2	3,3
1,o	1	3,6
o,3	62	o,8
o,1	66	o,7
o,o3	8o	o,2
o,o1	82	o,o

Tab. 2o Befruchtungshemmung und Endometrium-transformation

3. Die Fortdauer der Progesteronwirkung nach 8-tägiger Behandlung und darauffolgendem Entzug vor der Ovulation

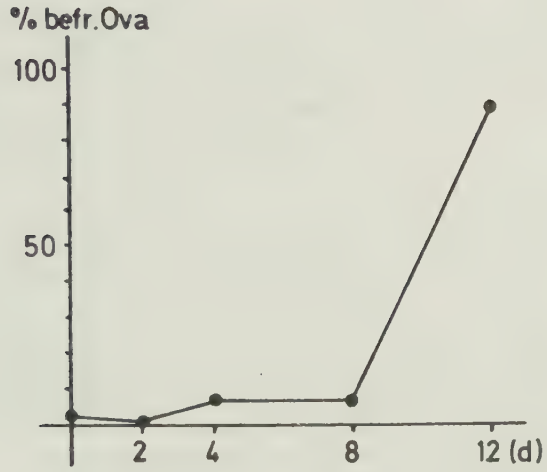
a) Die Befruchtung

21 Tiere wurden 8 Tage lang mit 1,o mg Progesteron/die s.c. bzw. 3,o mg Progesteron/die s.c. behandelt. Nach 2, 4, 8 und 12 Tagen ohne Progesteron-Behandlung wurde die Ovulation ausgelöst und inseminiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle und graphischen Darstellung zusammengefaßt (Abb. 21, Tab. 22).

Während nach der 8-tägigen Behandlung mit 1,o mg Progesteron die Befruchtung gehemmt war, wurden schon nach einem 2-tägigen Behandlungsintervall Befruchtungsraten erreicht, die praktisch denen der Kontrollen entsprechen. 4 Tage nach Behandlungsende liegen die Befruchtungsraten bei dem Parameter befruchtete Eier signifikant über den Werten der Kontrollen ($p < o,o5$). Dieses Experiment läßt trotz begrenzter Tierzahlen die Vermutung zu, daß einer Progesteron-Behandlung und folgendem Entzug eine Phase mit besonders günstigen Verhältnissen für die Befruchtung folgt. Die bekannte unmittelbar postpartal auftretende Konzeptionsbereitschaft des Kaninchens verdient hier Erwähnung.

Im Gegensatz zum Experiment mit 1,o mg Progesteron konnte nach 3,o mg Progesteron eine länger persistierende Hemmung der Befruchtung beobachtet werden. Hier zeigte sich, daß erst nach dem 8. Tag nach Ende der Progesteron-Behandlung der Prozentsatz der befruchteten Eier signifikant anstieg (Tag 8 nach Entzug 7 %, Tag 12 9o %); ($p < o,o5$).

Zusammenfassung: Nach einer niedrigen Progesterondosierung folgt eine schnellere Rückbildung des Hemmeffektes als bei einer höheren Dosierung; beiden Behandlungen folgt jedoch eine Phase, in der besonders günstige Verhältnisse für die Befruchtung herrschen.



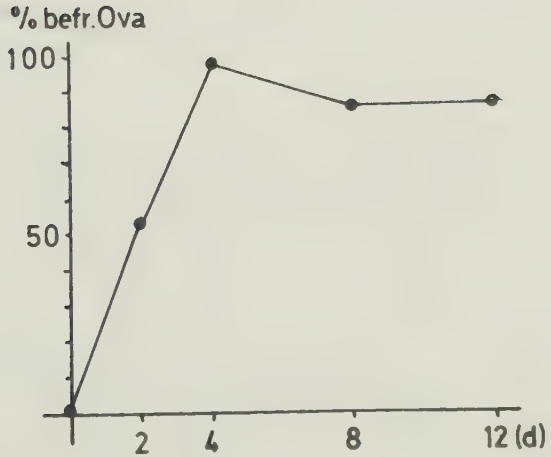


Abb. 21 Die Fortdauer der Befruchtungshemmung (oben nach 3,o mg/d, unten nach 1,o mg/d)

Prog.-Entzug nach 3,o mg pro Tag (d)	Tiere			Eier			Eier
	N(ges)	N(befr)	%	N(ges)	N(befr)	%	Tier
o	15	2	13	376	6	2 (1- 3)	25
2	2	o	o	51	o	o (o- 7)	25
4	3	1	33	3o	2	7 (1-22)	1o
8	2	1	5o	3o	2	7 (1-22)	15
12	2	2	1oo	5o	45	9o (78-97)	25
nach 1,5 mg (d)							
o	6	1	17	383	2	1 (o- 2)	64
2	3	3	1oo	139	73	53 (44-61)	46
4	3	3	1oo	55	54	98 (9o-1oo)	18
8	3	3	1oo	18o	155	86 (8o-9o)	6o
12	3	3	1oo	155	135	87 (81-91)	52

(...): 95 %-Vertrauensbereich für den wahren Anteilswert

Tab. 22 Die Fortdauer der Befruchtungshemmung nach 8-tägiger Progesteron-Behandlung und folgendem Entzug vor Ovulation und Insemination

b) Das Endometrium

Nach einer 8-tägigen Medikation von 1,o mg Progesteron pro Tag war bereits am 2. Tag nach Progesteron-Entzug die Endometrium-Transformation auf das Stadium 1 der McPhail Skala zurückgegangen. Die Befruchtungsraten stiegen erst 2 Tage später, also am 4. Tag nach dem Progesteron-Entzug auf Werte wie bei den Kontrollen an. Durch die höhere Dosierung (3,o mg pro Tag) blieben die progestionalen Veränderungen am Endometrium nach Absetzen der Progesteron-Behandlung länger erhalten. So war nach 2 und 4 Tagen der Progesteroneffekt noch deutlich vorhanden (McPhail 2 bzw. 1,4), erst 8 Tage nach Entzug waren diese Veränderungen nicht mehr nachweisbar. Unabhängig von den Veränderungen des McPhail Index blieb die Befruchtung bis zum 8. Tag nach der letzten Progesterongabe gehemmt. Erst am 12. Tag danach konnten wieder normale Verhältnisse beobachtet werden, obwohl zwischen Tag 8 und 12 keine Veränderungen am McPhail Index zu finden waren.

Bei dieser Versuchsanordnung läßt sich also keine Beziehung zwischen der Befruchtungshemmung und den progesteroninduzierten endometrialen Veränderungen darstellen.

Prog.-Entzug (d) nach 3,o mg/d	Befr.-Hemmung (% befr. Eier)	Endometrium (McPhail I)
o	2	3,3
2	o	2,o
4	7	1,4
8	7	o,5
12	9o	o,8
nach 1,o mg/d		
o	1	3,6
2	53	1,o
4	98	1,o
8	86	o,7
12	87	o,7

Tab. 23 Befruchtungshemmung und Endometriumtransformation

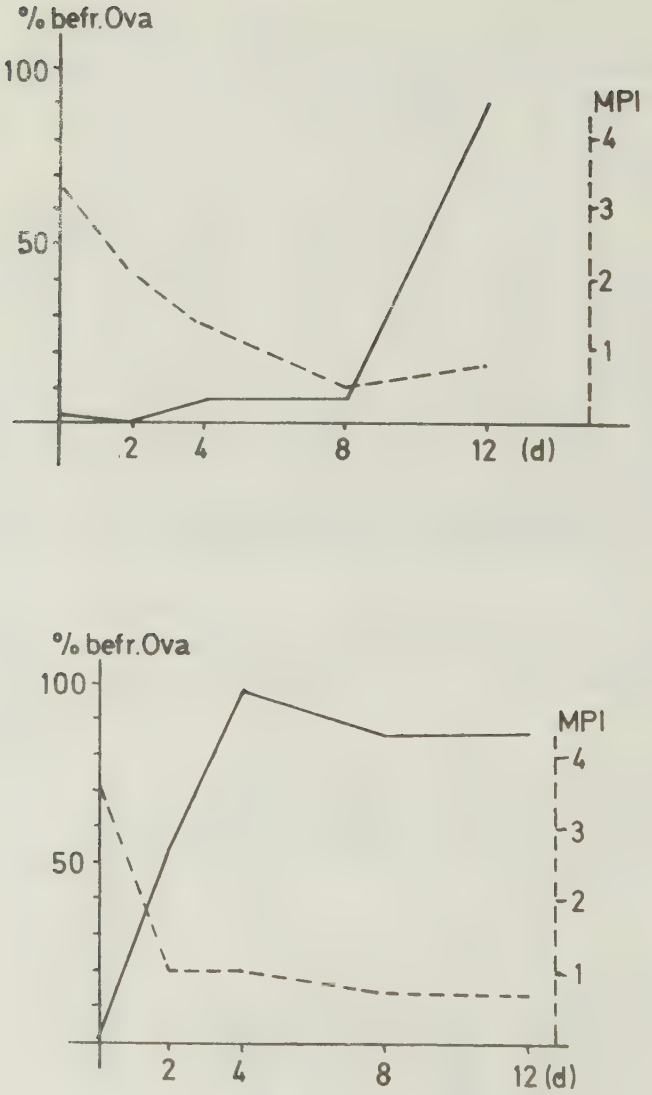


Abb. 24 Die Fortdauer der Befruchtungshemmung und der endometrialen Transformation (oben nach 3,o mg/d, unten nach 1,o mg/d)

4. Progestionale Endometrium-Transformation und Befruchtungshemmung (Individualanalyse der Tiere, die 4 Tage mit 3,o mg Progesteron/die s.c. behandelt und dann inseminiert wurden).

Wie Tabelle 25 zeigt, haben bei dieser kurzen Behandlungsdauer mit einer hohen Progesterondosis die Tiere entweder keine bzw. fast keine befruchteten Eier, oder sie haben hohe Befruchtungsraten. Zwischenwerte wurden nicht beobachtet. Das Endometrium war verschieden stark transformiert, denn es wurden McPhail Werte zwischen 1 und 4 beobachtet. Unabhängig von den endometrialen Veränderungen können bei einem McPhail Index von 3,5 noch 92 % und umgekehrt bei einem noch niedrigen McPhail Index auch 0 % der Eier bei einem einzelnen Tier befruchtet sein.

Eine Synchronisation der Befruchtungshemmung und der Veränderung am Endometrium konnte bei diesen kurz mit einer hohen Progesterondosis behandelten Tieren nicht gefunden werden.

Tier Nr.	% befr. Eier	McPhail Index
49o	o	1,o
491	o	2,5
284	o	3,o
285	o	4,o
792	o	2,o
44o	9	3,5
8o5	67	3,o
443	76	2,5
790	81	3,o
445	82	2,o
492	86	2,5
8o3	88	2,5
8o4	92	3,5
791	94	1,5

Tab. 25 Individualanalyse vom Tag 4

DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es

1. methodische Voraussetzungen für eine Pharmakologie der Befruchtung an einem geeigneten Modell zu schaffen,
2. die hormonale Steuerung der Befruchtung durch das natürliche Gelbkörperhormon Progesteron zu untersuchen und
3. die beobachteten Effekte in Beziehung zu setzen zu anderen besser erforschten Parametern einer Gestagenwirkung.

Ad 1: Durch die in Sequenz verabfolgten gonadotropen Hormone FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und HCG (menschl. Choriongonadotropin) läßt sich bei jungen geschlechtsreifen Kaninchen mit größter Sicherheit eine Superovulation auslösen. Dieser Effekt wird weder durch eine kurz- noch durch eine längerfristige vorausgehende bzw. simultane Verabfolgung von Progesteron positiv oder negativ beeinflußt.

Die Stimulierung von Follikeln und die damit vermutlich verbundene Sekretion von Oestrogenen hemmt ihrerseits den Effekt von zugeführtem Progesteron am Endometrium nicht. Die Stimulation durch Gonadotropine führt auch nicht zu einer störenden Progesteronproduktion der Ovarien.

Die vaginale Insemination von superovulierten weiblichen Tieren mit einer hohen Anzahl von Spermien (4o Mio) sichert bei einem hohen %-Satz der Tiere (92 %) die Befruchtung von Eizellen, sofern kein Progesteron vor der Ovulation verabfolgt wird.

Die Gewinnung von Sperma von männlichen Kaninchen mittels einer künstlichen Vagina erlaubt eine quantifizierbare Applikation von qualitativ gleichwertigen Ejakulatmengen. Die künstliche vaginale Insemination erlaubt es, die

psychosexuelle Rezeptivität unter Oestrogen- bzw. Nichtrezeptivität unter Progesteroneinfluß außer acht zu lassen.

Ad 2: Obwohl Progesteron auch in verschiedenste Funktionen z.B. des ZNS oder des Stoffwechsels (Leber) eingreift, ist es im wesentlichen das Hormon der Vorbereitung und Erhaltung der Gravidität.

Wie die angeführten Experimente zweifelsfrei beweisen, bewirkt Progesteron mit einer auffällig langen Latenz von 6 Tagen, dann aber schlagartig im Sinne eines Alles-oder-Nichts-Effektes eine Hemmung der Befruchtung. Aus anderen Experimenten (ELGER und BÜSING 1971) wissen wir, daß dieser Effekt über eine Beeinflussung der Zervix zustande kommt. Bei Umgehung der Zervix durch direkte intrauterine Insemination tritt das Phänomen der "Befruchtungshemmung" nicht in Erscheinung. Wir können also folgern, daß die unter Progesteron vermutlich verlangsamte oder gehemmte Kapazitation der Spermien im Uterus wenig oder nichts zum beobachteten Effekt beiträgt. Die benutzte Testanordnung ist also im wesentlichen ein Zervixfaktortest.

Es ist schwierig, sich über den "Sinn" des beobachteten Phänomens eine Meinung zu verschaffen. Einerseits ist es möglich, daß der Organismus sich in der Evolution die Möglichkeit verschafft hat, das Eindringen von Spermien in den Uterus während der Gravidität zu verhindern. Sie würden im Uterus eine unspezifische entzündliche Reaktion auslösen und so ggf. abortiv wirken (HAWK et al. 1963). Allerdings ist die sexuelle Bereitschaft weiblicher Kaninchen in der Gravidität generell so gering, daß man diese Hypothese schon deshalb bezweifeln muß. Alternativ ist zu überlegen, ob eher ein genereller zervikaler Verschlußmechanismus gegen das vaginale Milieu existiert,und ob der "nebenbei" bei der unphysiologischen Koinzidenz von Progesterondominanz und Insemination auch die Befruchtung verhindert (BEYER 1969).

Untersucht man das vorgeschlagene Versuchsmodell auf seine Relevanz beim Menschen, sind diese Überlegungen von geringerer Bedeutung, da die menschliche Sexualität im Gegensatz zu den Verhältnissen bei praktisch allen Nichtprimaten weder in der Lutealphase noch in der Gravidität zum Erliegen kommt, d.h. Progesteron keinen deutlichen Anti-Libidoeffekt hat (UDRY et al. 197o, MICHAEL et al. 197o).

Beachtung verdient der B-H-Effekt auch hinsichtlich seines zeitlichen Ablaufs und seines Charakters als Alles-oder-Nichts-Phänomen. In Interpretation dieser Vorgänge ist zu erwägen 1. ob entweder der zugrunde liegende Mechanismus wirklich erst nach einer Latenz von mehreren Tagen und dann absolut funktioniert und 2. die Möglichkeit, daß progredient die Spermienpassage in den Uterus behindert wird, ein Effekt auf die Befruchtung aber erst eintritt, wenn eine kritische Zahl von Spermien, die den Uterus erreicht, unterschritten wird. Für letztere Hypothese spricht u.a. die Beobachtung von CHANG, daß die Zahl der Spermien bei vaginaler Insemination über einen weiten Bereich (1oo Mio - 1 Mio) erniedrigt werden kann, ohne daß die Befruchtungsrate absinkt. Erst wenn die "kritische Zahl" 1oo ooo unterschritten wird, ist eine, und zwar dann meist vollständige, Hemmung zu beobachten (CHANG 1951b).

Zum Wesen von Hormonwirkungen gehört, daß sie sich in bestimmten Rhythmen abspielen. Es war daher auch die Frage zu klären, wie lange die Hemmung der Befruchtung durch Progesteron aufrecht erhalten werden kann. Nach einer Behandlungsdauer, die einer Gravidität beim Kaninchen entspricht (ca. 3o Tage), scheint der Effekt noch voll ausgeprägt. Nach 6o Tagen beobachteten wir bei den ersten Tieren eine Restitution der Fertilität, trotz Weiterbehandlung mit hohen Progesterondosen. Bei extrem langer Progesteron-Medikation von 213 Tagen war der Hemmeffekt vollends aufgehoben.

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluß ziehen, daß es nicht möglich ist, die Beeinflussung des "Zervixfaktors"

durch Progesteron ad infinitum fortzusetzen. Vielmehr scheinen mit der einfachen bis maximal zweifachen Dauer einer Gravidität gewisse Grenzen gesetzt zu sein, ohne daß wir über die biologischen Grundlagen etwas Genaueres sagen könnten.

Die Reversibilität der beschriebenen Effekte nach 8-tägiger Behandlung wurde ebenfalls untersucht. Hierbei machten wir die Erfahrung, daß mit dem Ende der Hemmwirkung von Progesteron extrem günstige Verhältnisse für eine Befruchtung eintreten, mit Befruchtungsraten, die signifikant über denen der Kontrollen liegen. Höhere Progesterondosierungen verzögern das Auftreten dieses "rebound phaenomens" erheblich.

Analoge Beobachtungen konnten auch unter Dosierungen unterhalb der endometrialen Schwelle von Progesteron (o,3; o,1; o,o3; o,o1mg/d s.c.) gemacht werden, unter denen die Verhältnisse für eine Befruchtung besonders günstig sind (8-tägige Vorbehandlung).

Diese Befunde passen gut zu der Tatsache, daß beim Kaninchen unmittelbar nach der Geburt optimale Verhältnisse für eine erneute Konzeption herrschen. Neuere Methoden zur Steroidbestimmung haben es ermöglicht, Progesteron in Blutplasma gravider Kaninchen zu bestimmen (HASAN 1971). Diese Untersuchungen ergaben vom 15. Tag p.c. an bis zur Geburt absinkende Progesteron-Plasmakonzentrationen. Schon Tage vor der Geburt liegen die Progesteronwerte sehr niedrig. Dies mag auch erklären, warum nach sehr hohen Progesterondosen die Restitution der Fertilität verzögert erfolgt.

Ad 3: Die Beziehung des Befruchtungs-Hemmeffektes zu endometrialen Progesteronparametern ist einfach zu umreißen.

1.) Es besteht keine kausale Beziehung zwischen Arborisation der Schleimhaut und B.-H.-Effekt, letzterer tritt im Verlauf später auf, als die Arborisation und überdauert (bei hoher Progesterondosis) die Reaktion des Endometriums nach Progesteronentzug (siehe S. 35, S. 42).

2.) Dosierungen von Progesteron, die sich nicht am Endometrium manifestieren, hemmen auch nicht die Befruchtung. Mit anderen Worten: Endometriale und zervikale Effekte erfordern dieselbe Schwellendosis von Progesteron (1,o mg/d s.c.).

3.) In bezug auf das Endometrium unterschwellige Dosierungen von Progesteron erhöhen die Fertilität superovulierter Kaninchen signifikant über das Niveau der Kontrollen.

Ausblick auf die Verhältnisse beim Menschen

Die Anwendung von Gestagenen in niedriger Dosierung bei kontinuierlicher Applikation (Minipille) verhindert den Eintritt einer Gravidität sicherer als sie die Ovulation hemmt. Je nach Präparat werden 1-3 % per anno gravid, während ca. 3o % mehr oder weniger regelmäßig ovulieren (GARCIA 1957, GUTIERREZ-NAJAR et al. 1968, HARPER 1963, ZANARTU et al. 1968). Neben der Hemmung der Befruchtung sind hierbei natürlich auch andere potentiell antifertile Mechanismen wie z.B. die Störung des endometrialen Zyklus oder der Corpus-luteum-Funktion in Betracht zu ziehen (RUDEL et al. 1965). Die Erfahrungen am Menschen decken sich weitgehend mit denen, die wir am Tier mit Progesteron gemacht haben, nämlich, daß die Beeinflussung verschiedener Gestagen-Parameter- wie Gonadotropinhemmung, endometriale und zervikale Faktoren - fast immer parallel gehen. Zur Vervollkommnung des Prinzips der"Minipille" wäre es daher erforderlich, Steroide mit neuen pharmakologischen Eigenschaften, d.h. mit größerer Organspezifität zu entwickeln.

Der Wert der hier entwickelten Testanordnung könnte darin liegen, ein relevantes Modell für entsprechende pharmakologische Bemühungen geliefert zu haben.

ZUSAMMENFASSUNG

A) Die Probleme des Bevölkerungsüberschusses und die verschiedenen Möglichkeiten der Fertilitätskontrolle werden aufgezeigt. Die Physiologie der Befruchtung und die Pharmakologie von Progesteron und Oestrogenen unter besonderer Berücksichtigung der Wirkung beider Hormone auf das weibliche Genitale und das männliche Sperma werden dargestellt und diskutiert.

B) Ein Versuchsmodell am Kaninchen wurde entwickelt, bei dem es unter anderem möglich ist
1. Sperma zu gewinnen und zu applizieren,
2. eine Superovulation beim juvenilen Kaninchen trotz Progesteronvorbehandlung auszulösen und
3. Eizellen aus dem Kaninchengenitale zu sammeln und zu klassifizieren.

C) In den Ergebnissen wird dargestellt, daß
1. unter hohen Progesterondosen die Befruchtung nach einer Latenz von 6 Tagen gehemmt wird,
2. diese Wirkung trotz Fortsetzung der Behandlung nicht ad infinitum aufrecht zu erhalten ist, sondern nach 6o Tagen unsicher wird und nach 213 Tagen aufgehoben ist,
3. die Schwelle bezüglich der Hemmung der Befruchtung bei einer Behandlungsdauer von 8 Tagen bei 1,o mg Progesteron pro Tier und Tag liegt,
4. in bezug auf die Endometrium-Transformation unterschwellige Progesterondosen fertilitätssteigernd wirken,
5. die Befruchtung nach Absetzen der Medikation dosisabhängig verschieden lange gehemmt bleibt und
6. keine kausale Beziehung zwischen der progesteroninduzierten Endometrium-Transformation - gemessen an der McPhail Skala - und der Befruchtungshemmung besteht.

LITERATURVERZEICHNIS

Adams, C.E. and M.C. Chang: Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and in the uterus.
J. exp. Zool. 151, 159-166 (1962)

Austin, C.R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg.
Australian J. Scientific Research 4, 581-597 (1951)

Austin, C.R. and M.W.H. Bishop: Capacitation of mammalian spermatozoa.
Nature (Lond.) 181, 851 (1958)

Austin, C.R. and A.W.H. Braden: Time relations and their significance in the ovulation and penetration of eggs in rats and rabbits.
Austr. J. Biol. Sci. 7, 179 (1954)

Barros, C., J.M. Bedford, L.E. Franklin and C.R. Austin: Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction.
J. Cell. Biol. 34, C 1 (1967)

Beatty, R.A.: Fertility of mixed semen from different rabbits.
J. Reprod. Fertil. 1, 52 (1960)

Bedford, J.M.: Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 8, 19-26 (1969)

Bedford, J.M.: Sperm capacitation and fertilization in mammals.
Biol. Reprod. Suppl. 2, 128-158 (1970 a)

Bedford, J.M.: The influence of oestrogen and progesteron on sperm capacitation in the reproductive tract of the female rabbit.
J. Endocr. 46, 191-200 (1970 b)

Bedford, J.M.: The saga of mammalian sperm from ejaculation to syngamy.
In: "Mammalian Reproduction". Gibian, H. and Plotz, E.J. (eds.), p. 124-182, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970 c)

Bedford, J.M. and M.C. Chang: Removal from decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation.
Amer. J. Physiol. 202, 179-181 (1962)

Bergmann, P.: Spermigration and cyclic changes in the cervical mucus.
Fertil. and Steril. 4, 183 (1953)

Beyer, C., N. Vidal and P.G. McDonald: Interaction of gonadal steroids and their effect on sexual behavior in the rabbit.
J. Endocr. 45, 4o7-413 (1969)

Bickers, W.: Sperm migration and uterine contractions.
Fertil. and Steril. 11, 286-29o (196o)

Black, D.L. and S.A. Asdell: Transport through the rabbit oviduct.
Amer. J. Physiol. 192, 63 (1958)

Black, D.L. and S.A. Asdell: Mechanism controlling entry of ova into rabbit uterus.
Amer. J. Physiol. 197, 1275 (1959)

Black, D.L., A. Kumar, L.V. Crowley, R.T. Duby and C.H. Spilman: Composition of oviduct fluid kept at two temperatures during collection from sheep.
J. Reprod. Fertil. 22/3, 597-6oo (197o)

Borell, N., O. Nilsson and A. Westmann: Ciliary activity in the rabbit fallopian tube during oestrus and after copulation.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 36, 22 (1957)

Boyarsky, L.H., H. Bayliss, L.E. Casida and R.K. Meyer: Influence of progesterone upon the fertility of gonadotropin-treated female rabbits.
Endocrinology 41, 312 (1947)

Braden, A.W.H.: Distribution of sperms in the genital tract of the female rabbit after coitus.
Austr. J. Biol. Sci. 6, 693 (1953)

Carleton, H.M. and H. Florey: Birth control studies: I. On the ingress of semen into the uterus during coitus.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp. 38, 55o (1931)

Carlson, D., D.L. Black and G.R. Howe: Oviduct secretion in the cow.
J. Reprod. Fertil. 22/3, 549-552 (197o)

Cary, W.H.: Duration of sperm cell migration in uterine secretions.
J. Amer. med. Ass. 1o6, 2221-2223 (1936)

Chang, M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes.
Nature (Lond.) 168, 697-698 (1951 a)

Chang, M.C.: Fertilization in relation to the number of spermatozoa in the fallopian tubes of the rabbit. Ann. ostet. e ginec. 73, 918 (1951 b)

Chang, M.C.: Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. Nature (Lond.) 175, 1036 (1955)

Chang, M.C.: A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. Nature (Lond.) 179, 258-259 (1957)

Chang, M.C.: Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female. Endocrinology 63, 619-628 (1958)

Chang, M.C.: Effects of progesterone and related compounds on fertilization, transportation and development of rabbit eggs. Endocrinology 81, 1251 (1967)

Chang, M.C. and J.M Bedford: Effects of various hormones on transportation of gametes and fertilization in the rabbit. Proc. 4th Int. Congr. Anim. Reprod. The Hague 367, (1961)

Cohen, M.R. and M. Perez-Pelaez: The Effect of Norethindrone Acetate-Ethinyl Estradiol, Clomiphene Citrate, and Dydrogesterone on Spinnbarkeit. Fertil. and Steril. 16, 141-150 (1965)

Cohen, M.R., I.F. Stein and B.M. Kaye: Spinnbarkeit: A characteristic of cervical mucus. Fertil. and Steril. 3, 201-209 (1952)

Demographic Year Book, United Nations (1969), New York (1970)

Diczfalusy, E.: Mode of action of contraceptive drugs. Amer. J. Obstet. Gynec. 100, 136 (1968)

Elger, W. and E.W. Büsing: Interference of steroids with fertilization. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 152, 71 (1971)

Elstein, M.: The effect of progestagens on cervical mucus. J. Reprod. Fertil. 22, 192 (1970)

Ericsson, R.J.: Technology physiology, and morphology of spermatozoa capacitation. J. Reprod. Fertil. 2, 65-74 (1967 a)

Ericsson, R.J.: A fluorometric method for measurement of sperm capacitation. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 125, 1115-1118 (1967 b)

Ericsson, R.J.: Methods for measurement of sperm capacitation in mammaes.
In: Advances in the Biosciences 4: Schering Symposium on mechanism involved in conception (1969).
Raspé, G. (ed.), Pergamon-Vieweg, Braunschweig (197o)

Forster, M.A. and H.L. Fevold: The interrelationship of the pituitary gonadotrophic hormones in follicular development and ovulation of the juvenile rabbit.
Amer. J. Physiol. 121, 625-632 (1938)

Fox, R.R.: Coitus as an ovulation stimulant in the laboratory rabbit.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 128, 639-641 (1968)

Fox, R.R. and W.L. Krinsky: Ovulation in the rabbit related to dosage of human chorionic gonadotropin and pregnant mare's serum.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 127, 1222-1227 (1968)

Fox, C.A., H.S. Wolff and J.A. Baker: Measurement of intrauterine pressures during human coitus by radiotelemetry.
J. Reprod. Fertil. 22, 243-251 (197o)

Garcia, C.R.: The oral contraceptive:An appraisal and review.
Amer. J. med. Sci. 253, 718 (1967)

Greenwald, G.S.: Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rabbit.
Anat. Rec. 13o, 477-496 (1958)

Gual, C., C. Becerra, E. Rice-Wray and J.W. Goldzieher: Inhibition of ovulation by estrogen.
Amer. J. Obstet. Gynec. 97, 443 (1967)

Gupta, D.N., J.N. Karkun and A.B. Kar: Effect of estrogen and progesterone on utero-tubal-junction of ovariectomized rabbits.
Endocrinology 55, 311-316 (197o)

Gutiérrez-Najar, A., H. Márquez-Monter, V. Cortéz-Gallegos, J. Giner-Velázquez and J. Martinez-Manautou: Presence of corpus luteum as evidence of ovulation in women treated with low doses of chlormadinon acetat.
Amer. J. Obstet. Gynec. 1o2, 1o18 (1968)

Haendle, H., H. Fritz, I. Trantschold and E. Werle: Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 343, 185 (1965)

Hafez, E.S.E.: Endocrine control of reception, transport, development and loss of rabbit ova.
J. Reprod. Fertil. 3, 14-25 (1962)

Hammerstein, J.: Theoretische Grundlagen der hormonalen Kontrazeption.
Med. Klin. 65, Nr. 27, 1279-1289 (1970)

Hamner, C.E., I.P. Jones and N.J. Soika: Influence of the hormonal state of the female on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa.
Fertil. and Steril. 19, 137-143 (1968)

Harper, M.J.K.: The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone.
J. Endocr. 22, 147 (1961)

Harper, M.J.K.: Ovulation in the rabbit: the time of follicular rupture and expulsion of the eggs in relation to injection to luteinizing hormone.
J. Endocr. 26, 307 (1963)

Harper, M.J.K.: Pharmacological control of reproduction in women.
Fortschr. Arzneimittel-Forsch. 12, 47-136 (1968)

Hartmann, C.G.: How do sperms get into the uterus?
Fertil. and Steril. 8, 403 (1957)

Hasan, S.H., F. Neumann, E. Friedreich und W. Elger: Levels of progesterone during pregnancy in rabbits as measured by radioimmunoassay.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 155, 107 (1971)

Hauser, P.M. (ed.): The American Assembly, Columbia University. The Population Dilemma.
Prentice-Hall, Inc. Engelwood Cliffs, N.J. (1960)

Hawk, H.W., G.D. Turner and T.H. Brinsfield: Endocrine control of vascular permeability and induced leucocytic emigration in the rabbit uterus.
Amer. J. vet. Res. 24, 595 (1963)

Heller, C.G., M.F. Lalli and M.J. Rowley: Factors affecting the testicular function in man.
Pharmacology of Reproduction
Pergamon Press Oxford and New York, 61-73 (1968)

Horne, H.W. jr. and J.P. Thibault: Sperm migration through the human female reproductive tract.
Fertil. and Steril. 13, 135-139 (1962)

Howe, G.R.: Leucocytic response to spermatozoa in ligated segments of the rabbit vagina, uterus and oviduct.
J. Reprod. Fertil. 13, 563 (1967)

Hunter, A.G. and H.O. Nornes: Characterisation and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization.
J. Reprod. Fertil. 2o, 419-428 (1969)

Jackson, M.C.N.: Oral contraception in practice.
J. Reprod. Fertil. 6, 153 (1963)

Kirton, K.T. and H.D. Hafs: Sperm capacitation by uterine fluid or beta-amylase in vitro.
Science 15o, 618-619 (1965)

Karim, S.M.: Prostaglandins in fertility control.
Lancet II 7673, 61o (197o)

Kelly, J.V.: Myometrial participation in human sperm transport: A dilemma.
Fertil. and Steril. 13, 84-92 (1962)

Kelly, W.A., J.H. Marston and P. Eckstein: Effect of an intra-uterine device on conception and ovulation in the rhesus monkey.
J. Reprod. Fertil. 19, 143-148 (1969)

Koester, H.: Ovum transport.
In: "Mammalian Reproduction". Plotz, H.J. and H. Gibian (eds.), 189-228,
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (197o)

MacLeod, J., R.Z Gold and C.M. McLane: Correlation of the male and female factors in human infertility.
Fertil. and Steril. 6, 122-143 (1955)

Maqueo, M., E. Perez-Vega, J.W. Goldzieher, J. Martinez-Manautou and H. Rudel: Comparison of the endometrial activity of 3 synthetic progestins used in fertility control.
Amer. J. Obstet. Gynec. 85, 427 (1963)

Marcus, S.L. and C.C. Marcus: Cervical mucus and its relation to infertility.
Obstet. Gynec. Surv. 19, 749-772 (1963)

Marston, J.H., W.A. Kelly and P. Eckstein: Effect of an intra-uterine device on gamete transport and fertilization in the rhesus monkey.
J. Reprod. Fertil. 19, 149-156 (1969 a)

Marston, J.H., W.A. Kelly and P. Eckstein: The effect of an intra-uterine device on uterine motility in the rhesus monkey.
J. Reprod. Fertil. 19, 321-33o (1969 b)

Masters, W.H. and V.E. Johnson: The human female: Anatomy of sexual response.
Minnesote Med. 43, 31 (196o)

Masters, W.H. and V.E. Johnson: Intravaginal environment I. A lethal factor.
Fertil. and Steril. 12, 560 (1961)

Mattner, P.E. and A.W.H. Braden: Spermatozoa in the genital tract of the ewe. I. Rapidity of transport.
Austr. J. Biol. Sci. 16, 473 (1963)

McCracken, J.A., M.E. Glew and R.J. Scaramuzzi: Corpus luteum regression induced by prostaglandin F_2 alpha.
J. Anam. Sci. 30, 544-546 (1970)

McDonald, M.F. and A.R. Belleve: Influence of oestrogen and progesterone on flow of fluid from the fallopian tube in the ovariectomized ewe.
J. Reprod. Fertil. 20, 51-62 (1969)

McPhail, M.K.: The assay of progestin.
J. Physiol. (Lond.) 83, 145 (1934)

Mears, E.: The clinical application of oral contraceptives.
In: "Biological council symposium on agents affecting fertility".
London, Churchill, 211 (1965)

Menge, A.C. and R. Verville: Effects of estrogen and progesterone on levels of corpora lutea and on pregnancy in heifers.
J. Anim. Sci. 28/2, 253 (1969)

Michael, R.P. and D. Zumpe: Rhythmic changes in the copulatory frequency of rhesus monkeys (Macaca mulatta) in relation to the menstrual cycle and a comparision with the human cycle.
J. Reprod. Fertil. 21/1, 199-202 (1970)

Moghissi, K.S., D. Dabich, J. Levine and O.W. Neuhaus: Mechanism of sperm migration.
Fertil. and Steril. 15, 15-23 (1964)

Morris MacLean, J. and G. van Wagenen: Compounds interfering with ovum implantation and development. III. Estrogens.
Amer. J. Obstet. Gynec. 96 804 (1966)

Murphee, R.L., W.G. Black, G. Otto and L.E. Casida: Effect of site of insemination upon the fertility of gonadotropin-treated rabbits of different reproductive stages.
Endocrinology 49, 474 (1951)

Murphee, R.L., E.J. Warwick, L.E. Casida and W.H. McShan: Influence of reproductive stage upon the fertility of gonadotropin-treated rabbits.
Endocrinology 41, 308 (1947)

Nicholson, R.: Vitality of spermatozoa in the endocervical canal.
Fertil. and Steril. 16, 758-764 (1965)

Nogales, F. und J. Botella-Llusia: Untersuchungen über den Zyklus der Zervixschleimhaut.
Zentralbl. Gynäk. 79, 159 (1957)

Noyes, R.W., C.E. Adams and A. Walton: Transport of spermatozoa into the uterus of the rabbit.
Fertil. and Steril. 9, 288 (1958 a)

Noyes, R.W., A. Walton and C.E. Adams: Capacitation of rabbit spermatozoa.
J. Endocr. 17, 374-38o (1958 b)

Odeblad, E.: The functional structure of human cervical mucus.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 47, Suppl. 1, 57 (1968)

Pincus, G.: Superovulation in rabbits.
Anat. Rec. 77, 1-8 (194o)

Pincus, G.: Some effects of progesterone and related compounds upon reproduction and development in mammals.
Acta endocr. (Kbh.) 23, Suppl. 28, 18 (1956)

Pinsker, M.C. and W.L. Williams: Spermatozoan decapacitation factor (DF) in human seminal plasma.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 129/2, 446 (1968)

Plotz, E.J.: Nebenwirkungen antikonzeptioneller Steroide.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 3, 194-211, 362-379 (197o)

Reynolds, S.R.M.: Studies on the uterus.
I. A method for recording uterine activity in chronic experiments on unanesthetized animals.
Amer. J. Physiol. 92, 42o-429 (193o)

Reynolds, S.R.M. and W.M. Allen: The effect of progestin-containing extracts of corpora lutea on uterine motility in the unanesthetized rabbit with observations on pseudopregnancy.
Amer. J. Physiol. 1o2, 39-55 (1932)

Rice-Wray, E., A. Aranda-Rosell, M. Maqueo and J.W. Goldzieher: Comparison of the long-term endometrial effects of synthetic progestins used in fertility control.
Amer. J. Obstet. Gynec. 87, 429 (1963)

Rock, J., G. Pincus and C.R. Garcia: Effects of certain 19-norsteroids on the normal human menstrual cycle.
Science 124, 891-893 (1956)

Roland, M.: A simple test for the determination of ovulation, estrogen activity and early pregnancy, using the cervical mucus secretion.
Amer. J. Obstet. Gnyec. 63, 81 (1952)

Roland, M.: Prevention of sperm migration into the uterine cavity by a microdose progestagen.
Fertil. and Steril. 21, No. 3, 211-216 (197o)

Rommer, J.J.: Sterility: Its cause and treatment.
Springfield, Ill. Thomas, 12 (1952)

Rudel, H.W., J. Martinez-Manautou and M. Maqueo-Tropete: The effect of progestogens in the hormonal control of fertility.
Fertil. and Steril. 16, 158-169 (1965)

Singer, A. and B.L. Reid: Effect of the oral contraceptive steroids on the ultrastructure of human cervical mucus - a preliminary communication.
J. Reprod. Fertil. 23, 249-255 (197o)

Sobrero, A.J. and J. MacLeod: The immediate postcoital test.
Fertil. and Steril. 13, 184 (1962)

Soupart, P.: Studies on the hormonal control of rabbit sperm capacitation.
J. Reprod. Fertil. 2, 49-63 (1967)

Sterchi, K.: Gegenwärtiger Stand der Antikonzeption. Ärztlich vertretbare und unvertretbare Methoden.
Ars medici, Verlag Lüdin AG, Liestal/Schweiz
Separata Heft 12 (1965)

Szollosi, D.G. and H. Ris: Observations on sperm penetration in the rat.
J. Biophysiol. Biochem. Cytol. 1o, 275 (1961)

Udry, J.R. and N.M. Morris: Effect of contraceptive pills on the distribution of sexual activity in the menstrual cycle.
Nature (Lond.) 227, 5o2-5o3 (197o)

Varian, N.B., R.R. Maurer and R.H. Foote: Ovarian response and cleavage rate of ova in control and FSH-primed rabbits receiving varying levels of luteinizing hormon.
J. Reprod. Fertil. 13, 67-73 (1967)

Waltron, A.: On the function of the rabbit cervix during coitus.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp. 37, 92 (193o)

Weil, A.J.: Immunological differentiation of epididymal and seminal spermatozoa of the rabbit.
Science (N.Y.) 131, 1o4o (196o)

Weinmann, D.E. and W.L. Williams: Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa.
Nature (Lond.) 2o3, 423-424 (1964)

Wiquist, N. and M. Byddeman: Therapeutic abortion by local administration of prostaglandin. Lancet II 7675, 716-717 (197o)

Zanartu, J.: Effect of synthetic oral gestagens on cervical mucus and sperm penetration. Int. J. Fertil. 9, 225 (1964)

Zanartu, J., M. Pupkin, D. Rosenberg, R. Gaerrero, R. Rodrigez-Bravo, M. Garcia-Huidobro and J.A. Puga: Effect of oral continous progeston therapy in microdosage on human ovary and sperm transport. Brit. Med. J. 1, 266 (1968)

Zanefeld, L.J.D., P.N. Srivastava and W.L. Williams: Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. J. Reprod. Fertil. 2o, 337-34o (1969)

Herrn Professor Dr. med. Martin Kramer danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit.
Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Walter Elger, dessen wissenschaftliche Beratung und unermüdliche Hilfe diese Arbeit erst entstehen ließen.
Dank schulde ich auch dem Leiter des Departments Endokrinpharmakologie der Firma Schering AG, Herrn Privatdozent Dr. Friedmund Neumann, und seinen Mitarbeitern, besonders Fräulein Helga Altmann.
Der graphischen Abteilung der Schering AG und Frau Birgit Ostwald danke ich für die Herstellung der graphischen Darstellungen und Photos.
Der Firma Schering AG danke ich für die großzügige finanzielle Hilfe, die ich während der Dauer meiner Tätigkeit erhielt.

Lebenslauf

Am 22.4.1944 wurde ich als Sohn des Dr. med. Karl Wilhelm Büsing und seiner Ehefrau Margarete geb. Paul in Göttingen geboren. 1951 zogen wir nach Berlin. Dort bestand ich am 3.3.1964 an der Waldoberschule (Neusprachliches Gymnasium) die Reifeprüfung. Im Sommersemester desselben Jahres wurde ich an der Freien Universität Berlin, Medizinische Fakultät, immatrikuliert. Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung am 26.3.1965 studierte ich ein Semester an der Christian-Albrecht-Universität in Kiel. Nachdem ich - wieder in Berlin - am 6.10.1966 die ärztliche Vorprüfung bestanden hatte, studierte ich ein Semester an der Université Mixte de Médecine et de Pharmacie in Marseille (Frankreich). Die ärztliche Prüfung legte ich am 13.8.1970 in Berlin ab und bin seit dem 21.9.1971 approbierter Arzt.